Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Eine Methode zur gaschromatografischen Bestimmung der 17-Oxo-Steroide im Urin als Routine-Untersuchung im Vergleich zum papierchromatografisch-photometrischen Verfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Christoph v. Chamier-Glisczinski
aus Regensburg

1980

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Eine Methode zur gaschromatografischen Bestimmung der 17-Oxo-Steroide im Urin als Routine-Untersuchung im Vergleich zum papierchromatografisch-photometrischen Verfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Christoph v. Chamier-Glisczinski
aus Regensburg

1980

Dekan: Professor Dr. G. Rassner
Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Meiner Frau
und
meinen Eltern

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. P. Göbel für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die bereitwillige Beratung bei den Versuchen. Gleichzeitig bedaure ich zu tiefst sein Ableben.

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. D. Gupta, der sich liebenswürdigerweise bereiterklärt hat dieses Thema zu übernehmen, außerdem herzlichen Dank für die Beratung und Korrektur bei der schriftlichen Abfassung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. F. Heni, Direktor der Medizinischen Poliklinik der Universität Tübingen, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Arbeitsgeräte und der notwendigen Hilfsmittel.

Inhaltsübersicht: Seite

1.	E i n l e i t u n g	1
2.	A u f g a b e	2
3.	M a t e r i a l i e n	2
3.1.	zu untersuchende Substanzen	2
3.1.1.	Androsteron	2
3.1.2.	Ätiocholanolon	2
3.1.3.	Dehydro-Epiandrosteron	2
3.1.4.	11-Oxo-Androsteron	2
3.1.5.	11-Oxo-Ätiocholanolon	2
3.1.6.	11β-Hydroxy-Androsteron	3
3.1.7.	11β-Hydroxy-Ätiocholanolon	3
3.1.8.	Standardsubstanzen	3
3.2.	Reagenzien	3
3.2.1.	Fraktionierung und Girard-Trennung	3
3.2.2.	Photometrische Bestimmung der Gesamt-17-Oxo-Steroide	3
3.2.3.	Silylierung zur gaschromatografischen Trennung	3
3.2.4.	verwendete Trennsäulen	4
3.2.5.	verwendete Gase	4
4.	M e t h o d i k	4
4.1.	Beschreibung des bisher durchgeführten Verfahrens	4
4.1.1.	Enzymatische Hydrolyse	4
4.1.2.	Ätherextraktion	5
4.1.3.	Einengen der Ätherextrakte	5
4.1.4.	Girard-Trennung	5
4.1.5.	Photometrische Bestimmung der Gesamt-17-Oxo-Steroide	6
4.1.6.	Papierchromatografische Auftrennung der 17-Oxo-Steroide	8

		Seite
4.1.6.1.	Auftragen der Extrakte	8
4.1.6.2.	Anfärbung und quantitative Bestimmung	8
4.2.	Versuche und Beschreibung des neu durchzuführenden Verfahrens	9
4.2.1.	Prinzip der GLC und Versuchsanordnung	10
4.2.2.	Silylierung	11
4.2.3.	Trennung des 17-Oxo-Steroidgemisches bzw. von vorbereiteten Urinproben	14
4.2.3.1.	Beschreibung des Analysengerätes	14
4.2.3.2.	verwendete Trennsäulen	15
4.2.3.3.	Wahl der Analysenbedingungen	16
4.2.3.3.1.	Trägergas und Trägergasgeschwindigkeit	16
4.2.3.3.2.	Temperatur im Einspritzblock	17
4.2.3.3.3.	Säulenofentemperatur	17
4.2.3.3.4.	Detektor	18
4.2.4.	Durchführung der Versuche	19
4.2.5.	Quantitative Bestimmung der 17-Oxo-Steroide im Urin mit Hilfe der Gaschromatografie	21
4.2.5.1.	Arbeitsgang der Standardisierung	23
4.2.5.2.	Arbeitsbedingungen am Gaschromatografen	23
4.2.5.3.	Berechnung und Eichkurve	24
5.	E r g e b n i s s e	32
5.1.	Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Säulen unter variierten Betriebsbedingungen	32
5.1.1.	Säule OV 1	32
5.1.1.1.	Untersuchung an Einzelsubstanzen	32
5.1.1.2.	Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen	37
5.1.2.	Säule SE 30	38
5.1.2.1.	Untersuchung an Einzelsubstanzen	38
5.1.2.2.	Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen	40
5.1.3.	Säule OV 225	41
5.1.3.1.	Untersuchung an Einzelsubstanzen	41
5.1.3.2.	Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen	42

Seite

5.1.3.3. Verwendung einer neuen Säule OV 225 43

5.1.4. Säule XE 60 44

5.1.4.1. Untersuchung an Einzelsubstanzen 44

5.1.4.2. Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen 47

5.1.4.3. Chromatogramme von Untersuchungen an Urinen 48

5.2. Ergebnisse der Untersuchungen an Urinen von Patienten im Vergleich zur herkömmlichen photometrischen Bestimmung 50

6. D i s k u s s i o n 54

6.1. Die Notwendigkeit der Fraktionierung von 17-Oxo-Steroiden 54

6.2. Untersuchung an verschiedenen Säulen 56

6.3. Genauigkeit und Wiederfindungsrate der entwickelten gaschromatografischen Methode 57

6.3.1. Durchführung 57

6.3.2. Ergebnis der prozentualen Wiederauffindung 57

6.4. Vergleich der quantitativen Ergebnisse beider Verfahren 58

6.5. Vergleich mit anderen Autoren 59

7. Z u s a m m e n f a s s u n g 62

8. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s 63

Verwendete Abkürzungen:

GLC	Gas-Flüssigkeits-Chromatografie
FID	Flammenionisationsdetektor
TG	Trägergas
GDF	Gasdurchflußgeschwindigkeit
Rt-Zeit	Retentionszeit
I	Temperatur im Einspritzblock
O	Temperatur im Säulenofen
D	Temperatur des Detektors
IST	Interner Standard
A	Androsteron
Ä	Ätiocholanolon
DHEA	Dehydro-Epiandrosteron
11-O-A	11-Oxo-Androsteron
11-O-Ä	11-Oxo-Ätiocholanolon
11β-OH-A	11β-Hydroxy-Androsteron
11β-OH-Ä	11β-Hydroxy-Ätiocholanolon
G	Gemisch

1. Einleitung

Seit mehr als fünfzehn Jahren werden die franktionierten 17-Oxo-Steroide routinemäßig bestimmt. Diese Untersuchungsmethode ist sehr wichtig geworden und hat viel zur Erkennung, Bestimmung und Differenzierung verschiedener endokriner Krankheitsbilder beigetragen, insbesondere bei Erkrankungen der Nebennierenrinde. So z.B. beim Hirsutismus, Adrenogenitalen Syndrom (AGS), 3β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase-Mangel, sowie dem adrenalen Hirsutimus.

Die quantitative fraktionierte Bestimmung von 17-Oxo-Steroiden, Pregnandiol und Pregnantriol bekommt auch immer mehr Bedeutung bei der Diagnose von Nebennierenrindencarzinomen oder bei Funktionsstörungen der Gonaden, Sheehans disease, Morbus Addison etc..

Verschiedene Methoden, die zur Bestimmung der Metabolite im Urin in der Vergangenheit beschrieben worden sind, wie die Papier- (3, 32 u. 33), Dünnschicht- und Säulenchromatografie (2, 6, 12, 17, 18, 22-24, 26, 31 u. 34), scheinen gute und effiziente Trennverfahren zu ergeben. Dazu gehören auch die Kapillarsäulen-Gas-Flüssigkeits-Chromatografie (8, 13, 14 u. 3o) und die hochauflösende Flüssigkeits-Chromatografie (7 u. 15), die beide als die empfindlichsten Methoden gelten.

Die meisten dieser in der Literatur beschriebenen Verfahren sind in der Routine-Analysen-Methode nicht zu verwenden, da die Vorbereitung und Trennung einen zu hohen Zeitaufwand benötigt und diese Verfahren unrentabel machen.

2. Aufgabe

Das Anliegen dieser Arbeit war ein für die Routinebestimmung gut durchführbares Verfahren zur franktionierten Auftrennung der 17-Oxo-Steroide zu erarbeiten. Es soll qualitativ und quantitativ auswertbar sein und die bisher zeitraubende und aufwendige Methode ablösen. Die Beschleunigung des Verfahrens sollte durch die Einführung der Gas-Flüssigkeits-Chromatografie erreicht werden.

Als wesentliche weitere Aufgabe war zu erfüllen, die gefundene Methode so auszuarbeiten, damit eine spätere Vollautomatisierung mit der Gaschromatografie möglich wird.

3. Materialien

3.1. zu untersuchende Substanzen

3.1.1. Androsteron

Schering AG, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170-172

3.1.2. Ätiocholanolon

Schering AG, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170-172

3.1.3. Dehydro-Epiandrosteron

Schering AG, 1000 Berlin 65, Müllerstraße 170-172

3.1.4. 11-Oxo-Androsteron

Steraloids, INC. Wilton, NH 03086

3.1.5. 11-Oxo-Ätiocholanolon

Steraloids, INC. Wilton, NH 03086

3.1.6. 11β-Hydroxy-Androsteron

Steraloids, INC. Wilton, NH 03086

3.1.7. 11β-Hydroxy-Ätiocholanolon

Steraloids, INC. Wilton, NH 03086

3.1.8. Standardsubstanzen

5α-Cholestan-3-on: E. Merck, 6100 Darmstadt
Frankfurter Straße 250

Δ^4-Androsten 3,11,17-trion: E. Merck,
6100 Darmstadt
Frankfurter Straße 250

3.2. Reagenzien

3.2.1. Fraktionierung und Girard-Trennung

Sämtliche Reagenzien, die bei dem beschriebenen Verfahren (siehe 4. Methodik) zur Anwendung kamen, waren von der Firma:
E. Merck, 6100 Darmstadt, Frankfurter Straße 250

3.2.2. Photometrische Bestimmung der Gesamt-17-Oxo-Steroide

Dinitrobenzol 2% , Kalilauge 5N und Äthanol 95%ig der Firma:
E. Merck, 6100 Darmstadt, Frankfurter Straße 250

3.2.3. Silylierung zur gaschromatografischen Trennung

Methode 1: Hexamethyldisilazan (HMDS) und
Trimethylchlorsilan (TMCS):
Fa.: Macherey - Nagel & Co. Düren
Dimethylformamid: E. Merck, Darmstadt

Methode 2: Hexamethyldisalazan (HMDS) und
Trimethylchlorsilan (TMCS):
Fa.: Macherey - Nagel & Co. Düren
Tetrahydrofuran: E. Merck, Darmstadt

Methode 3: *N*-Trimethylsilylimidazol (TSIM)
Fa.: Macherey - Nagel & Co. Düren
Tetrahydrofuran: E. Merck, Darmstadt

Methode 4: *N*-Methylsilyltrifluoracetamid (MSTFA)
Fa.: Macherey - Nagel & Co. Düren
Tetrahydrofuran: E. Merck, Darmstadt

3.2.4. verwendete Trennsäulen

a) Silicongummi OV 1 auf Chromosorb G
b) Siliconöl OV 225 auf Chromosorb W
c) Silicongummi SE 30 auf Chromosorb W
d) Nitrilsiliconöl XE 60 auf Chromosorb P

Säulen und Säulenfüllmaterialien a-d der Firma:
Bodenseewerk Perkin Elmer & Co. GmbH. Überlingen

3.2.5. verwendete Gase

a) Trägergas: N_2: Gasflaschenwerk Tübingen

b) Flammengase: H_2 und O_2: Gasflaschenwerk Tübingen

4. Methodik

4.1. Beschreibung des bisher durchgeführten Verfahrens

4.1.1. Enzymatische Hydrolyse

Mit Essigsäure (100%ig) wird der Urin auf pH 4,6-4,8 angesäuert. Anschließend wird mit 10 ml Acetatpuffer pro 100 ml Urin und 300 Einheiten β-Glucuronidase pro 1 ml Urin versetzt. Dabei sollte das Enzym eher großzügig abgewogen werden, damit eine vollkommene Hydrolyse gewährleistet ist. Es folgt eine dreitägige Hydrolyse im Brutschrank bei 37°C.

4.1.2. Ätherextraktion

Urin nach Hydrolyse evtl. kühlstellen. Ansäuern mit 8 ml konz. H_2SO_4 pro 100 ml Urin. Es folgt eine 3 tägige kontinuierliche Extraktion mit Äther im Kutscher-Steudel-Apparat unter Verwendung eines Elektro-Spiegel-Kochers bei ca. 40-50°C.
Dann werden Äther und Urin im Schütteltrichter (im Abzug) ausgeschüttelt, die Urinphase jeweils verworfen und die Ätherphase gemessen.
Die vereinigten Ätherextrakte werden ausgewaschen:

1 mal mit 1/10 Vol. Alkali = 1/3 gesättigte Sodalösung
2/3 Natronlauge 10%ig
2 mal mit Natronlauge 10%ig 1/10 Volumen
3-4 mal mit 1/10 Vol. Aqua dest. bis zur Neutralität.

4.1.3. Einengen der Ätherextrakte

Im Rotationsverdampfer wird der Äther bei ca. 35°C abdestilliert. Der Extrakt wird in 2-4 ml Äthanol abs. gelöst, in ein Girardglas gefüllt und im Exsikkator eingeengt.

4.1.4. Girard-Trennung

Reagenzien: Girard-Reagenz T in 10 ml Essigsäure lösen (37°C) mit Äthanol abs. auf 50 ml auffüllen

Natronlauge 2,5%ig (gekühlt)

wassergesättigter Äther: 10 ml Äther + 5 ml Aqua dest. im Schütteltrichter schütteln und anschließend das sich absetzende Wasser verwerfen.

konzentrierte Schwefelsäure

Tetrachlorkohlenstoff = 8 ml CCl_4 + 2 ml Äther p.A.

Durchführung: Zum Extrakt werden 2 ml Girard-Reagenz gegossen, locker zugestopft, 1 1/2 Stunden im Wasserbad bei 86°C stehengelassen. Dann werden 8 ml gekühlte 2,5%ige NaOH zugesetzt, gut geschüttelt und sofort ins Eisbad (3 Min.) gestellt. Anschließend wird mit 5 ml wassergesättigtem Äther 1 1/2 Minuten kräftig geschüttelt.
Die Ätherschicht wird mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen, bzw. aufgefangen zur Nichtketon-Bestimmung.
Es folgen drei Ausschüttelungen mit wassergesättigtem Äther. Der Äther wird jeweils abgesaugt. Das gewonnene Eluat wird mit 0,3 ml H_2SO_4 konz. versetzt, vorsichtig umgeschüttelt und 1 1/2 - 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nun schüttelt man 4 Min. kräftig mit 10 ml des Tetrachlorkohlenstoff-Äther-Gemisches, wäscht mit 4 ml NaOH 1,25%ig durch kurzes Umschütteln aus und saugt die obere Schicht ab. Anschließend wird 2-3 mal mit je 5 ml Aqua dest. bis zur Neutralität ausgewaschen.
Zuletzt saugt man auch die Sicherheitsschicht ab und engt im Exsikkator ein.

4.1.5. Photometrische Bestimmung der Gesamt-17-Oxo-Steroide

Extrakt in 4 ml Äthanol p.A. lösen. Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenzien: Androsteron Standard (4°C)

Dinitrobenzol 2% (4°C)
20 g Dinitrobenzol ad 1000 ml Äthanol

Kalilauge 5N (4°C)
330 g Kaliumhydroxidplätzchen in
1000 ml H_2O dest.

Äthanol 95%ig
5 ml Aqua dest. auf 100 ml Äthanol abs.

Tab. 1: Ansatz zur photometrischen Bestimmung der 17-Oxo-Steroide

	Leerwert	20 γ Standard	40 γ Standard	Analyse
Äthanol abs. ml	0,2	0,1		0,1
Androsteron Standard ml		0,1	0,2	
Analyse ml				0,1
Dintrobenzol 2% ml	0,2	0,2	0,2	0,2
Kalilauge 5N ml	0,2	0,2	0,2	0,2
1 1/2 Stunden im Wasserbad bei 25°C stehenlassen				
Äthanol 95% ml	3,0	3,0	3,0	3,0

Am Photometer wird bei einer Wellenlänge von 515 nm und bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm gemessen.

Berechnung: Zur Berechnung werden jeweils die Mittelwerte der Extinktionen aus den Doppelbestimmungen genommen.

$$\frac{\text{Extinktion Analyse} \cdot 20 \cdot 40}{\text{Extinktion Standard I (20 } \gamma)} = \text{Gesamtmenge der 17-Oxo-Steroide im Ansatz}$$

Beispiel: Extinktion Analyse : 0,31
Extinktion Standard I : 0,24

$$\frac{0{,}31 \cdot 20 \cdot 40}{0{,}24} = 1033\ \gamma = 1{,}033 \text{ mg im Ansatz}$$

24 Stdn.-Urin: 1500 ml
17-Oxo-Steroide pro Ansatz 300 ml = 1,033 mg

$$\frac{1{,}033 \text{ mg} \cdot 1500 \text{ ml}}{300 \text{ ml}} = 5{,}165 \text{ mg 17-Oxo-Steroide/die}$$

Der restliche in Alkohol gelöste Extrakt (3,8 ml) wird im Exsikkator eingeengt.

4.1.6. Papierchromatografische Auftrennung der 17-Oxo-Steroide

4.1.6.1. Auftragen der Extrakte:

Streifen: Carl Schleicher & Schüll, D-3354 Dassel
Nr.: 2043 b Mgl
4 x 72 cm
Selekta

Es werden immer zwei Streifen angelegt (Kontrolle). Die Streifen werden mit 20 ml Propylenglykol, 80 ml Aceton p.A. (gut gemischt) imprägniert und hochkant gestellt.
Der Extrakt wird in 0,1 ml Dichlormethan pro Streifen und 800-1200 γ gelöst und möglichst zügig und dünn aufgetragen (Mikrospritze mit gebogener Kanüle 12er).

Feuchtigkeitskammer:

Methylcyclohexan (Merck-Schuchardt)
gesättigt mit Propylenglycol

Der Streifen wird eingehängt und die Feuchtigkeitskammer fest verschlossen. Die Laufzeit beträgt bei konstanter Zimmertemperatur (Luftzug vermeiden) ca. 24-40 Stunden und ist abhängig von der Temperatur, der Menge der Kammerfüllung und dem Streifenknick (Kapillarkraft).
Nach Beendigung der Auftrennung den Streifen herausnehmen und einen Tag lang gut an der Luft trocknen lassen.

4.1.6.2. Anfärbung und quantitative Bestimmung:

Reagenzien: Dinitrobenzol-Lösung 2% (+ 4°C)
Kalilauge (+ 4°C)
Äthanol p.A.

30 ml Dinitrobenzol, 16 ml Kalilauge und 85 ml Äthanol p.A. werden gut vermischt und schnell zusammengegossen (fleischrote Lösung). Dann zieht man den Streifen gleich-

mäßig rasch durch und trocknet ihn im Trockenofen auf schwächster Stufe.

Sofort im Analytrol schreiben bei:
mittlerer Lichtöffnung vor der Quarzlampe, Filter 500 (müssen stets gleichgerichtet sein) Rundscheibe Can B 5

Genauere Vorschrift zu diesen Angaben in 4.1. siehe auch Lit. 1.

4.2. Versuche und Beschreibung des neu durchzuführenden Verfahrens

Die beiden zu vergleichenden Untersuchungsmethoden zur quantitativen Gewinnung der 17-Oxo-Steroide sind bis einschließlich der Gesamtkonzentrations-Bestimmung der 17-Oxo-Steroide im 24 Stdn.-Urin identisch.
Die Verfahren differieren im Prinzip bei der Trennung der einzelnen Komponenten.

Bei der unter 4.1. beschriebenen Methode erfolgt die Auftrennung durch Papierchromatografie mit anschließender Anfärbung und quantitativ - colorimetrischer Auswertung. Im Folgenden soll die Fraktionierung der 17-Oxo-Steroide mit Hilfe der Gas-Flüssigkeits-Chromatografie (GLC) erfolgen. Sie ist der Papierchromatografie in mehreren Punkten überlegen. Sie kann schneller durchgeführt werden, ist genauer und eignet sich zur quantitativen Auswertung.

4.2.1. Prinzip der Gas-Flüssigkeits-Chromatografie und Versuchsanordnung

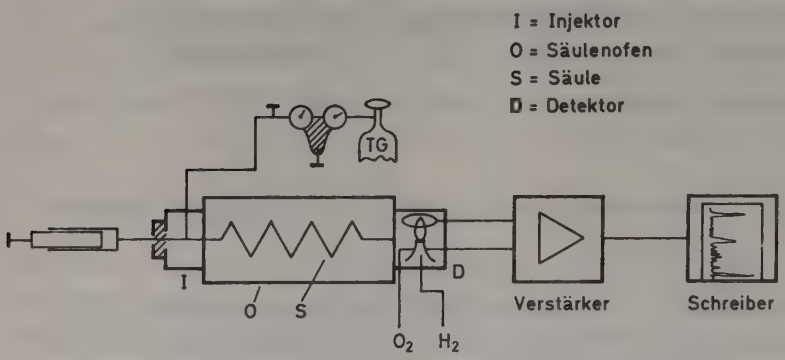


Abb. 1: Schematische Versuchsanordnung der Gas-Flüssigkeits-Chromatografie

Eine Substanz wird in den sogenannten Injektor eingebracht, bei hoher Temperatur verdampft und von einem als Trägergas bezeichneten Gasstrom durch eine Glassäule geleitet. Sie ist mit einem mit Flüssigkeit belegten Trägermaterial gefüllt. Mit Hilfe eines Detektors, der aus einer Knallgas-Flamme und einer Ringkathode besteht, kann man eine ankommende Substanz durch den entstehenden Ionisationsstrom über einen Verstärker messen und mittels eines angeschlossenen Schreibers aufzeichnen.

Die Menge der Substanz, die ankommt, ist proportional der Dauer des Ionisationsstroms und somit der Höhe und der Breite eines Peaks am Schreiber, also seiner Fläche. So besteht die Möglichkeit der quantitativen Auswertung. Das Prinzip der gaschromatografischen Auftrennung ist nun ein Trägermaterial bzw. die aufgebrachte Flüssigkeitsschicht zu finden, die die Komponenten eines durchströmenden Gemisches verschieden lang festhält, sodaß sie zu bestimmten Zeiten (Retentionszeiten) am Detektor getrennt erscheinen.

Die Auftrennung ist durch das mit Flüssigkeit beschichtete Trägermaterial (Säulenfüllung), die Trägergasstromgeschwindigkeit, das Trägergas an sich und die Temperaturen im Injektor, in der Säule und im Detektor beeinflußbar. Durch Variation dieser Faktoren kann man versuchen eine Verbesserung und Optimierung der Trennung von chemisch sehr ähnlichen Substanzen zu erreichen. Dazu ist eine große Zahl von Versuchen nötig, da es sich um sehr viele, voneinander unabhängige, variable Parameter handelt. Im Folgenden sollen nun einige dieser Versuche und ihre Ergebnisse beschrieben werden.

4.2.2. Silylierung

Bei der GC-Bestimmung sind sehr hohe Temperaturen notwendig, um die zu untersuchenden Substanzen gasförmig und damit überhaupt für die GC nutzbar zu machen. Deshalb müssen diese Verbindungen zuerst in eine thermisch stabile Form gebracht werden. Dies gilt im besonderen Maße für die Steroidhormone, da diese Verbindungsklasse thermisch sehr instabil ist. Es müssen daher thermisch stabile Derivate gefunden werden, die sich gut trennen lassen und eine quantitative und reproduzierbare Ausbeute im Gaschromatografen gewährleisten. (16)

Eine gute Methode, die allen diesen geforderten Bedingungen entspricht, ist die Silylierung. Darunter versteht man die Bindung der Hydroxyl- und Oxo-Gruppierungen der Steroide unter Bildung von Silylätherverbindungen.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten diese Silylierung durchzuführen. In dieser Arbeit wurden einige versucht, um die günstigste im Sinne der gestellten Aufgabe zu ermitteln.

Methode 1: 1 mg Steroid bzw. Urinprobe getrocknet
2 ml Dimethylformamid
2 ml Hexamethyldisalazan (HMDS)
1 ml Trimethylchlorsilan (TMCS) als Katalysator
12 Stdn. bei Raumtemperatur stehenlassen.

Dieses Verfahren hat sich nicht bewährt und wurde schnell wieder verlassen, da das DMF nie wasserfrei genug zu bekommen ist. Das enthaltene Wasser führt zu einem Tailing unter dem die Auflösung des Chromatogramms stark leidet. Außerdem sind die entstandenen Silylierungsprodukte auf Dauer nicht stabil genug.

Methode 2: 1-10 mg der Probe werden mit 1,0 mg wasserfreiem THF, 0,2 ml HMDS und 0,1 ml TMCS versetzt. Ausfallendes NH_4Cl stört nicht.
(Falls sich die Probe nicht innerhalb von 5 Min. löst, erwärmt man auf 75-85°C)
12 Stdn. bei Raumtemperatur stehenlassen.

Methode 2 stellt eine Verbesserung gegenüber der Methode 1 dar, da hierbei das weitgehend wasserfreie THF verwendet werden konnte. Ein mehr oder weniger starkes Ausfallen von NH_4Cl stört im Gegensatz zur Angabe in der Vorschrift bei der Handhabung der Substanz in der Gaschromatografie doch sehr z.B. bei der Probenaufgabe durch Verstopfen der Spritze.

Außerdem hat die bei beiden Methoden verwendete Mischung aus HMDS und TMCS den Nachteil, daß das als Katalysator enthaltene Trimethylchlorsilan eine zerstörende Wirkung auf die Steroide ausübt. Von Vorteil ist aber die Mitsilylierung der sterisch gehinderten 11β-Hydroxygruppe. Am stärksten ist diese negative Wirkung am Dehydro-Epiandrosteron nachweisbar. Dabei nimmt nach wenigen Tagen die Konzentration des enthaltenen DHEA immer mehr ab. (16)

Methode 3: 10 mg der Probe werden in 0,8 ml THF gelöst, 0,2 ml *N*-Trimethylsilylimidazol (TSIM) werden zugesetzt. Der Reaktionsansatz kann auf 60-70°C erhitzt werden. Die Mischung wird direkt analysiert.

Dabei wurden gute Trennergebnisse erzielt. Es ergab sich eine befriedigende Auflösung der Chromatogramme und eine gute Reproduzierbarkeit. Das Reagenz ist im Gegensatz zu Methode 1 und 2 an der Luft stabil und das fertige Reaktionsprodukt ist sofort zu verwenden. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist die lange Haltbarkeit des Produkts.

Methode 4: 1 mg Steroid oder eingedampfte Urinprobe werden mit 1 ml THF gelöst. Davon werden 100 µl mit 100 µl *N*-Methylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) versetzt.
Man erhitzt entweder eine Stunde lang auf 60°C und kann das Reaktionsprodukt direkt in den GC einspritzen oder läßt das Ganze 18 Stunden bei Raumtemperatur stehen und kann es dann ebenfalls direkt verwenden. Besser ist es, wenn man unter N_2 bis zur Trockne eindampft, mit 100 µl THF wieder aufnimmt und dann erst einspritzt.

Dieses Verfahren hat verschiedene Vorteile. Es kann schnell eingesetzt werden, das Reaktionsprodukt ist lange haltbar und die Ergebnisse der Analysen sind sehr gut reproduzierbar. Durch Zugabe einer bestimmten Menge des internen Standards bei der Silylierung wird diese Standardsubstanz gleich mitsilyliert. Damit wird eine quantitative Bestimmung möglich.

4.2.3. Trennung des 17-Oxo-Steroidgemisches bzw. von vorbereiteten Urinproben

4.2.3.1. Beschreibung des Analysengerätes

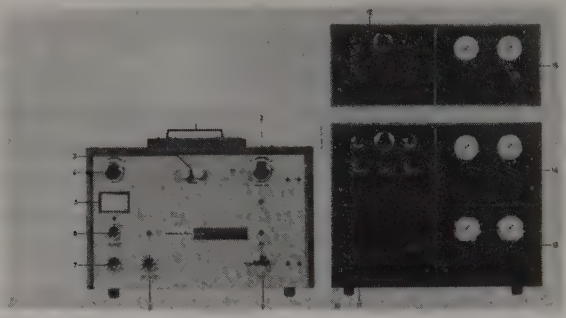


Abb. 2: Analysengerät F 20 FE Fraktometer mit zwei Verstärkern von Perkin-Elmer & Co. GmbH.

Es wurde das Gaschromatografiegerät F 20 FE Fraktometer von Perkin-Elmer mit Einsatz eines Flammenionisationsdetektors verwendet.

Ein Allglassystem, das nach (9) für empfindliche Substanzen, wie es die 17-Oxo-Steroide darstellen, benutzt werden sollte, kam ebenfalls zum Einsatz. Es besteht aus einem Glasröhrchen (ca. 12 mm Länge und 1 mm lichte Weite) im Einlaßteil der Probenaufgabe und aus einer gewickelten Glassäule (2 m Länge und 2,7 mm Innendurchmesser), die mit der jeweiligen Säulenfüllung beschickt ist.

Als Trägergas verwendete man gereinigten Stickstoff. Die Trägergasgeschwindigkeit wurde in den jeweiligen Versuchen variiert. Die Injektor-, Säulen- und Detektortemperatur wurde je nach Säulenfüllung unterschiedlich gewählt, um optimale Trennergebnisse zu erzielen. Ein Flammenionisationsdetektor (FID), wie oben beschrieben, bildete den Abschluß des Weges der Substanz durch die Apparatur. Die von ihm abgegebenen Ionisationsströme

werden mit Hilfe eines Verstärkers und elektrischen Tintensysthemschreibers optisch in Form von Peaks sichtbar gemacht.

Diese Versuchsanordnung könnte noch erweitert werden, nachdem die optimalen Trennbedingungen festliegen. Zum Beispiel kann ein automatischer Probenaufgeber am Ausgang ein elektronischer Peakflächenintegrator angebracht werden. Ein angeschlossener Rechner wirft die Ergebnisse gleich in Zahlen aus. So wäre eine Arbeitseinheit in der routinemäßigen Bestimmung der 17-Oxo-Steroide geschaffen.

4.2.3.2. verwendete Trennsäulen

a) OV 1
flüssige Phase: Silicongummi OV 1
Belegung in Gew.%: 1 Gew.%
Trägermaterial: Chromosorb G
AW - DMCS
mesh - Bereich: 80 - 100

b) OV 225
flüssige Phase: Siliconöl OV 225
Belegung in Gew.%: 3 Gew.%
Trägermaterial: Chromosorb W
AW - DMCS
mesh - Bereich: 80 - 100

c) SE 30
flüssige Phase: Silicongummi SE 30
Belegung in Gew.%: 3 Gew.%
Trägermaterial: Chromosorb W
AW - DMCS
mesh - Bereich: 80 - 100

d) XE 60
flüssige Phase: Nitrilsiliconöl XE 60
Belegung in Gew.%: 3 Gew.%
Trägermaterial: Chromosorb P
AW - DMCS
mesh - Bereich: 80 - 100

Lit.: 29

Bei der Belegung und Auswahl des Trägermaterials ist verschiedenes zu beachten. Einerseits muß genügend stark mit flüssiger Phase belegt werden, um eine zufriedenstellende Trennung zu erhalten, denn bei mangelnder Belegung tritt Zersetzung ein, andererseits müssen die Retentionszeiten im erträglichen Rahmen gehalten werden. Die 17-Oxo-Steroide zeichnen sich durch unterschiedlichen chemischen Aufbau aus, haben aber den gleichen Dampfdruck. H. Gleispach (10) gibt deshalb zur Trennung der 17-Oxo-Steroide für die stationäre Phase ein Nitril-Siliconöl XE 60 als vorteilhaft an.

4.2.3.3. Wahl der Analysenbedingungen

4.2.3.3.1. Trägergas und Trägergasgeschwindigkeit

Es ist ein Gas zu wählen, das bestimmte Bedingungen erfüllen muß:

1. Es darf in der stationären Phase nicht löslich sein, sonst ergibt sich ein Druckabfall.
2. Die Viskosität des Gases muß genügend klein sein.

In Frage kommen H_2, He, Ar, N_2, Co_2.

H_2 : wäre das beste Trägergas, es besteht jedoch die Gefahr der Knallgasbildung. Deshalb ist es in der Routine zu gefährlich.

He : hat eine kleine Viskosität, ist aber zu teuer.

Ar : die Viskosität ist zu groß.

N_2 : ist billig, hat eine größere Viskosität als He. Es muß gereinigt werden, da sonst die stationäre Phase zersetzt werden kann.

CO_2: wird in der präparativen Gaschromatografie verwendet.

Für diese Aufgabe wurde im Hinblick auf die Verwendung als Routineuntersuchung gereinigter N_2 gewählt, da er relativ billig und ungefährlich ist.

Als Trägergasgeschwindigkeit ist ein Wert zu wählen, der es den zu trennenden Substanzen ermöglicht, genügend lang an der flüssigen Phase zu bleiben, aber nicht zu lange Analysenzeiten ergibt.

4.2.3.3.2. Temperatur im Einspritzblock

Die Wahl der Temperatur im Injektor hat die Aufgabe einen Temperaturbereich zu finden, bei dem die Probe möglichst augenblicklich verdampft, dann als gasförmige Substanz vorliegt und so durch die Analysensäule mit Hilfe des Trägergasstromes mitgenommen werden kann. Wenn die Temperatur zu hoch ist, zersetzt sich die Probe und durch die Säule gelangen nur Zersetzungsprodukte. Das Ergebnis der Trennung wäre im höchsten Maße verfälscht und nicht zu verwenden.

4.2.3.3.3. Säulenofentemperatur

Es ist nicht möglich eine einfache Beziehung anzugeben, nach der die optimale Arbeitstemperatur aus einfach zu erhaltenden Daten zu berechnen ist. Es gibt nur einige Regeln und die Möglichkeit aus den Ergebnissen von praktischen Versuchen, also empirisch, die optimale Temperatur zu ermitteln.

Regeln:
1. Die Arbeitstemperatur sollte so hoch sein, daß die verwendete Trennflüssigkeit möglichst niedrig viskös ist, jedoch dann keinen nennenswerten Dampfdruck besitzt.
2. Die optimale Temperatur liegt bei höchstens 100°C unter dem mittleren Siedepunkt der Analysensubstanzen. Das gilt bei engsiedenden Gemischen und bei Verwendung normaler Mengen zur Analyse. Sie kann bis max. 200°C unter dem

Siedepunkt der höchstsiedenden Komponente liegen, wenn nur Gammamengen und Ionisationsdetektoren verwendet werden. In diesem Fall soll die Temperatur des Probengebers bis zu 100°C höher als die Säulentemperatur liegen.

3. Die Trenntemperatur darf bei den Siedetemperaturen der Komponenten liegen. In diesem Fall besitzen die Substanzen an normalen, 1 m langen Trennsäulen der GLC Retentionszeiten von 1-2 Minuten. (21)

4.2.3.3.4. Detektor

Bei der zu lösenden Aufgabe wurde ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt.

Eigenschaften des FID:

1. Temperaturempfindlich, praktisch unempfindlich gegen Änderungen des Trägergasdruckes bzw. des Gasmengenstroms, wenn reinste Gase (d.h. frei von Kohlenwasserstoffen und anderen verbrennbaren Substanzen, jedoch verunreinigt mit Wasser, CO_2 und anderen org. Gasen) und praktisch unverdampfbare Trennflüssigkeiten eingesetzt werden.
2. Unempfindlich gegen mechanische Erschütterungen.
3. Kleinstmögliches Detektorenvolumen verwendbar kleiner als ein Mikroliter.
4. Sehr kleine Zeitkonstante (ca. 8 Millisekunden)
5. Außerordentlich kleines Rauschen (in der Größenordnung um 10^{-24} m.

Der Detektor spricht nicht an auf:

H_2O, H_2S, CO, CO_2, CS_2, COS, SO_2, SO_3, COOH, HCN, NO , N_2O, NO_2, N_2O_3, NH_3 etc..

H_2, N_2, O_2 und alle anderen anorganischen Gase, außer solchen die relativ leicht ionisierbar sind wie Halogene etc.

ferner alle weiteren Verbindungen, die keinen Kohlenstoff enthalten.

Der Detektor erfaßt alle organischen Substanzen, die beim Verbrennen schließlich CO_2 liefern, sofern sie eine C-H-Bindung besitzen. Ausnahme: HCOOH und HCHO
Er besitzt bei richtigem Aufbau einen sehr großen dynamischen Bereich, in dem er linear die angebotene verbrennbare Substanz in einen Ionenstrom umwandelt.
Zur Vermeidung von Kondensatabscheidungen sollte der Detektor künstlich beheizt werden und die Meßelektrode, sowie die Flamme des Detektors heiß gehalten werden. Es sollen keinerlei Wärmeverluste zugelassen werden und kein He als Trägergas verwendet werden. (20)

Aus dem oben Gesagten folgt, daß dieser Detektortyp für die gestellte Aufgabe gut geeignet ist.
Die Wahl der Temperatur hängt von der Substanz ab und wurde bei allen Versuchen bei 260°C konstant verwendet.

4.2.4. Durchführung der Versuche

An Hand des folgenden Diagramms soll noch einmal der Weg vom Urin bis zur gaschromatografischen Auftrennung dargestellt werden.(Siehe Abb. 3, Seite 20)

Zu den vorbereitenden Versuchen zählen auch die oben beschriebenen Silylierungsmethoden, die den Sinn hatten, das optimalste Verfahren für die weitere Lösung der Trennaufgabe zu ermitteln.

Als nächstes wurden die unter 4.2.3.2. angeführten gaschromatografischen Trennsäulen mit verschiedenen Temperaturen, Trägergasgeschwindigkeiten und Mengen der 17-Oxo-Steroide untersucht. Zuerst wurden die Retentionszeiten der jeweiligen Einzelsubstanzen ermittelt. Nachdem eine gute Trennung erreicht war, konnten in später untersuchten Testgemischen die verschiedenen Einzelsubstanzen identifiziert werden.

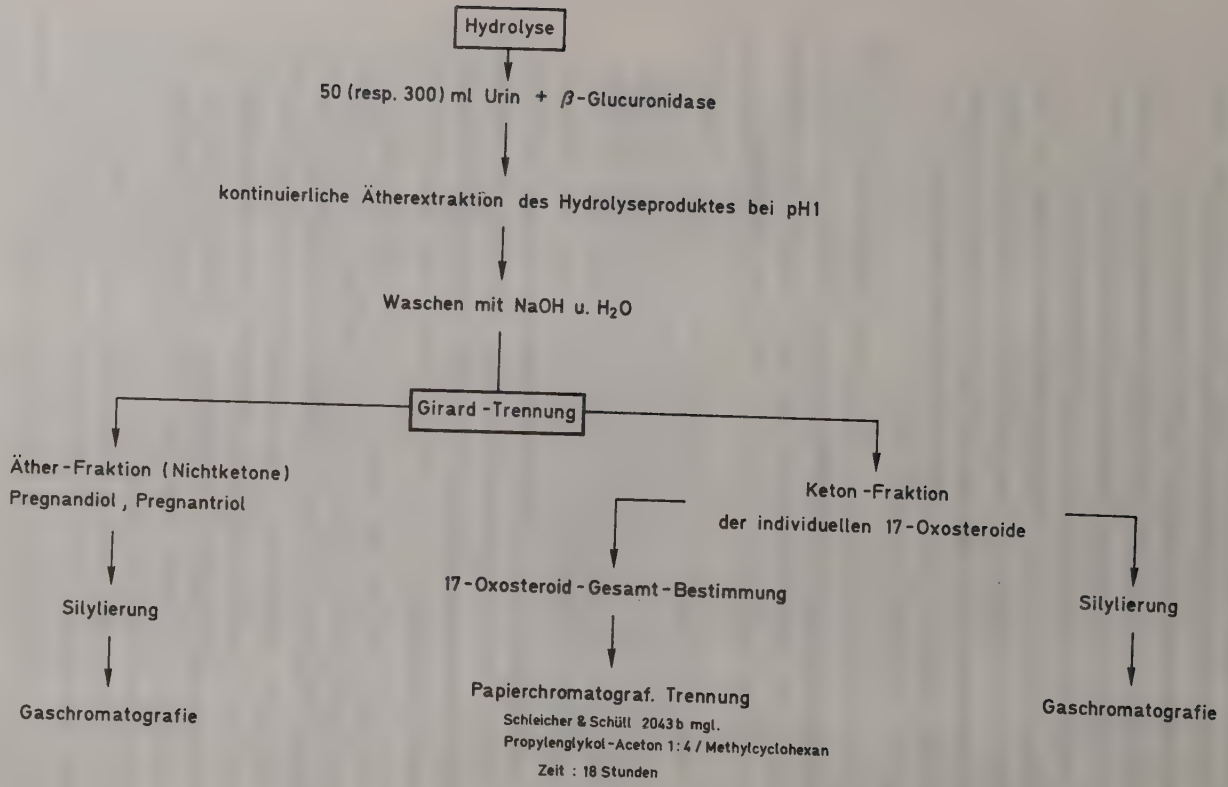


Abb. 3: Bestimmung der 17-Oxo-Steroide, Pregnandiol und Pregnantriol im Urin

Von einer guten Auftrennung ist dann zu sprechen, wenn jeder Peak, der einer bestimmten Substanz zuzuordnen ist, wieder auf die Nullinie zurückkehrt, sodaß man für eine Substanz einen vollständigen Peak besitzt. Nur ein vollständiger Peak entspricht der Substanzverteilung einer Gauß'schen Glockenkurve. Wenn diese Bedingung erreicht ist, jeder Peak getrennt vom anderen auf dem Papier steht, kann man aus seiner Fläche auf die Menge der Einzelsubstanz schließen. Damit wird auch eine quantitative Auswertung der Franktionierung der 17-Oxo-Steroide möglich.

In dem folgenden Kapitel über die Ergebnisse dieser Versuche werden die Schwierigkeiten, die bei diesem Verfahren aufgetreten sind, sichtbar. Wenn man bei den Einzelsubstanzen gut getrennte Retentionszeiten erhielt, dann aber das Gemisch einspritzte, war die Trennung schlecht. Das entstand durch zu schnelle Überlastung der Säule oder lange Tailings usw.. Man mußte eine geeignete Säule finden, die bei optimaler Trennleistung auch eine hohe Belastung aushält. Ferner mußten Bedingungen in der Säule hergestellt werden, damit die Retentionszeiten genügend voneinander entfernt sind, um für die aufgegebenen Gemische bzw. Urine, wie oben beschrieben, gute Bedingungen zur Auswertung zu erhalten.

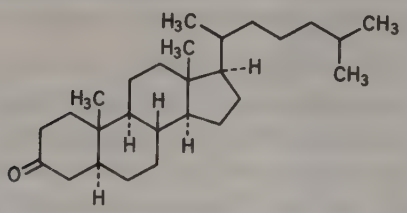
Als diese Versuche abgeschlossen waren, konnte das Ganze an Urinen angewandt werden.

4.2.5. Quantitative Bestimmung der 17-Oxo-Steroide im Urin mit Hilfe der Gaschromatografie

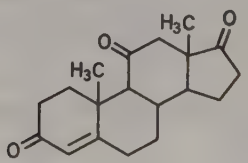
Nachdem nun die Aufgabe einer guten qualitativen Fraktionierung mit der geeignetsten Säule und optimalen Bedingungen gelöst war und gute reproduzierbare Chromatogramme erhalten wurden, war noch das Problem der quantitativen Bestimmung der einzelnen Fraktionen zu bearbeiten. Als gute Möglichkeit erwies sich die Verwendung eines Internen

Standards. Man versteht darunter, daß man dem Testgemisch oder dem Urin eine bestimmte Menge einer Substanz zusetzt, die ähnliche Retentionszeiten besitzt. Diese sollen jedoch noch deutlich voneinander zu unterscheiden sein.

Als Interner Standard wurde die Substanz Cholestanon (5α-Cholestan-3-on) verwendet, vor allem an der XE 60 - Säule.



Bei der OV 225 - Säule konnte das Adrenosteron (Δ^4-Androsten-3,11,17-trion) als Interner Standard mit Erfolg eingesetzt werden.



Der jeweilige Interne Standard wurde gleich zu der zu silylierenden Substanz gegeben und mitsilyliert.
Der Vorteil dieser Methode ist, daß das Testgemisch bzw. der zu untersuchende Urin eine definierte Menge an Internem Standard enthält. Damit werden Silylierungsfehler, Dosierungsfehler, sowie Fehler, die beim zweimaligen Einspritzen in den Gaschromatografen, sei es durch schwankende Temperatur, Gasfluß, oder auch Verschmutzung der Säule, entstehen würden, ausgeschlossen.

Um eine reproduzierbare quantitative Aussage über den Gehalt an 17-Oxo-Steroiden im Testgemisch bzw. Urin machen zu können, ist es vorteilhaft, sich eine Eichkurve von jedem einzelnen Steroid anzulegen, um daraus einen Faktor zur Berechnung der jeweiligen Mengen ermitteln zu können.

4.2.5.1. Arbeitsgang der Standardisierung

a) Standardlösung: 10 mg Adrenosteron bzw. Colestanon in 10 ml THF

b) Ansatz:

Tab. 2: Mischungsverhältnisse zur Standardisierung

	von jedem Steroid in THF gelöst	Interner Standard	Silylierungsreagenz MSTFA
	µl	µl	µl
Probe A:	500	200	100
Probe B:	400	200	100
Probe C:	200	200	100
Probe D:	100	200	100

Die Proben jeweils 1 Std. bei 60°C reagieren lassen, dann im N_2-Strom zur Trockne eindampfen.
Jede Probe wird nun in 100 µl THF aufgenommen, in den Gaschromatografen gespritzt (0,4 µl) und analysiert.

4.2.5.2. Arbeitsbedingungen am Gaschromatografen

Tab. 3: Übersicht der Betriebstemperaturen der verwendeten Säulen

Säule	Temperatur			TG	GDF
	I°C	O°C	D°C		$kp \cdot cm^{-2}$
XE 60	280	210	260	N_2	1,5 ≙ 45 $ml \cdot min^{-1}$
OV 225	275	233	270	N_2	1,5 ≙ 45 $ml \cdot min^{-1}$

Bei diesen Bedingungen an beiden Säulen war das Trennergebnis nahezu gleich gut. In einer weiterführenden Arbeit sollte gleichzeitige Abtrennung von den Nichtketonen Pregnandiol und Pregnantriol angestrebt werden.
Dies ist auf der OV 225 besser möglich als auf der XE 60. Deshalb wurde hier die quantitative Auswertung mit der Erstellung von Eichkurven, der Ausmessung von Urinen und dem Vergleich mit dem papierchromatischen Verfahren an der OV 225 vorgenommen.

4.2.5.3. Berechnung und Eichkurve

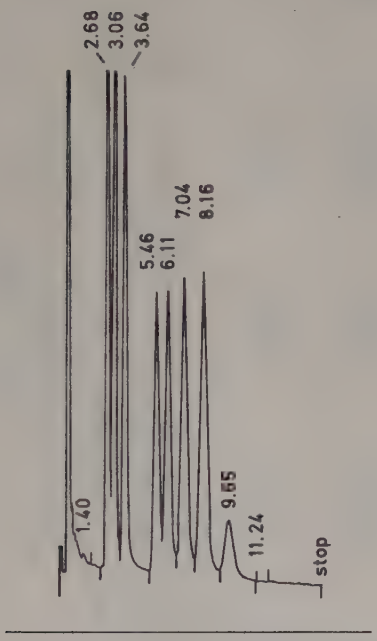
Der Faktor F ergibt sich aus der Fläche des Peaks der Substanz A_S dividiert durch die Fläche des Peaks des Internen Standards A_{IST}

$$F = \frac{A_S}{A_{IST}}$$

Werden die F-Werte auf der Abszisse zu der Konzentration der Probe auf der Ordinate aufgetragen, erhält man als Gerade die Eichkurve.

Man kann nun an Hand der gewonnenen Eichkurve auf den Gehalt der unbekannten Substanz schließen, da der Gehalt an Internem Standard gleich ist, bzw. im Verhältnis zu einer definierten Menge der gesuchten Substanz steht.

Abb. 4: Beispiel einer quantitativen Auswertung im Rechner mit Flächenintegrator



RT	AREA
1.40	879
2.68	202801
3.06	233281
3.64	219636
5.46	162754
6.11	190228
7.04	229828
8.16	263760
9.65	68596
11.24	48

Tab. 4: Einzelwerte der verschiedenen Substanzen zur Ermittlung der Eichkurven bzw. des Faktors E

Menge µl	Rt-Wert min	Fläche Substanz	Fläche IST	F-Wert	Konz.	Faktor E
Androsteron:					Bez.: X	
100	2,69	30572	50152	0,61	1	1,6
200	2,68	65885	56312	1,17	2	1,7
400	2,69	146128	62448	2,34	4	1,7
500	2,68	202801	68596	2,95	5	1,7

IST = Interner Standard

Fortsetzung der Tab. 4:

Menge µl	Rt-Wert min	Fläche Substanz	Fläche IST	F-Wert	Konz.	Faktor E
Ätiocholanolon:					Bez.: ⊗	
100	3,06	34986	50152	0,70	1	1,4
200	3,06	77147	56312	1,37	2	1,5
400	3,06	169858	62448	2,72	4	1,5
500	3,06	233281	68596	3,40	5	1,5
Dehydro-Epiandrosteron:					Bez.: •	
100	3,67	34234	50152	0,68	1	1,5
200	3,64	73206	56312	1,30	2	1,5
400	3,65	159867	62448	2,56	4	1,6
500	3,64	219636	68596	3,20	5	1,6
11-Oxo-Androsteron:					Bez.: Δ	
100	5,48	24252	50152	0,48	1	2,0
200	5,46	53496	56312	0,95	2	2,1
400	5,47	117402	62448	1,88	4	2,1
500	5,46	162754	68596	2,37	5	2,1
11-Oxo-Ätiocholanolon:					Bez.: ⊙	
100	6,12	26896	50152	0,54	1	1,7
200	6,11	62506	56312	1,11	2	1,8
400	6,12	137386	62448	2,20	4	1,8
500	6,11	190228	68596	2,77	5	1,8
11β-Hydroxy-Androsteron:					Bez.: ○	
100	7,05	29494	50152	0,59	1	1,7
200	7,04	70953	56312	1,26	2	1,6
400	7,05	164238	62448	2,63	4	1,5
500	7,04	229828	68596	3,35	5	1,5
11β-Hydroxy-Ätiocholanolon:					Bez.: ●	
100	8,16	34254	50152	0,68	1	1,5
200	8,16	80526	56312	1,43	2	1,4
400	8,16	187968	62448	3,01	4	1,3
500	8,16	263760	68596	3,84	5	1,3

IST = Interner Standard

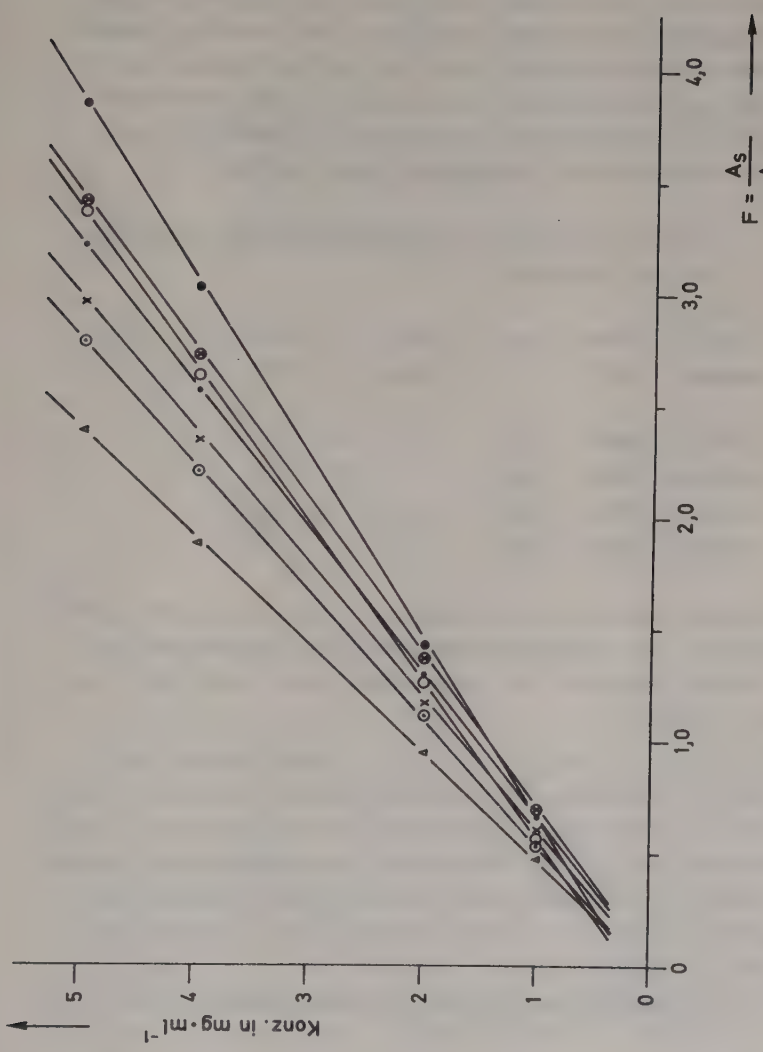


Abb. 5: Eichkurven für die verschiedenen Substanzen

Betrachtet man die Abb. 5, so stellt sich heraus, daß sich für jedes der 17-Oxo-Steroide eine bestimmte Eichkurve mit verschiedener Steigung ergibt.
Man erhält eine Kurvenschar mit relativ geringer Streuung der Kurven zueinander. Man kann daher eine Eichkurve mit noch genügender Genauigkeit erhalten, wenn man den Gesamtgehalt der 17-Oxo-Steroide, das ist die Durchschnittssumme der einzelnen Flächen der Peaks, durch die Fläche des Internen-Standardpeaks dividiert und gegen die jeweiligen verschiedenen Konzentrationen aufträgt.

Tab. 5: Durchschnittswerte zur Ermittlung der Eichkurve bzw. des Faktors E

Menge µl	Fläche Substanz	Fläche IST	F-Wert	Konz. $mg \cdot ml^{-1}$	Faktor E
500	214612,57	68596	3,13	5	1,60
400	154692,42	62448	2,48	4	1,61
200	69102,71	56312	1,23	2	1,62
100	30669,71	50152	0,61	1	1,64

Der Vorteil dieser Vereinfachung ist, daß man nur mit einer Eichkurve in der Routinebestimmung der 17-Oxo-Fraktionierung arbeiten braucht. Die Ergebnisse sind dabei noch ausreichend genau.

Wie die Eichkurve (Abb. 6, Seite 29) zeigt, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen dem F-Wert und der Konzentration der Substanz. Das bedeutet, daß auch die Fläche der Substanz in linearer Beziehung zur eingespritzten Menge der Substanz steht. Man kann infolge dieser linearen Beziehung einen Faktor E aus der Steigung der Kurve angeben (s.a. Tab. 4 und Tab. 5).
Multipliziert man diesen Faktor mit dem F-Wert = $\frac{A_S}{A_{IST}}$,

kann man direkt die enthaltene Menge der Substanz angeben.

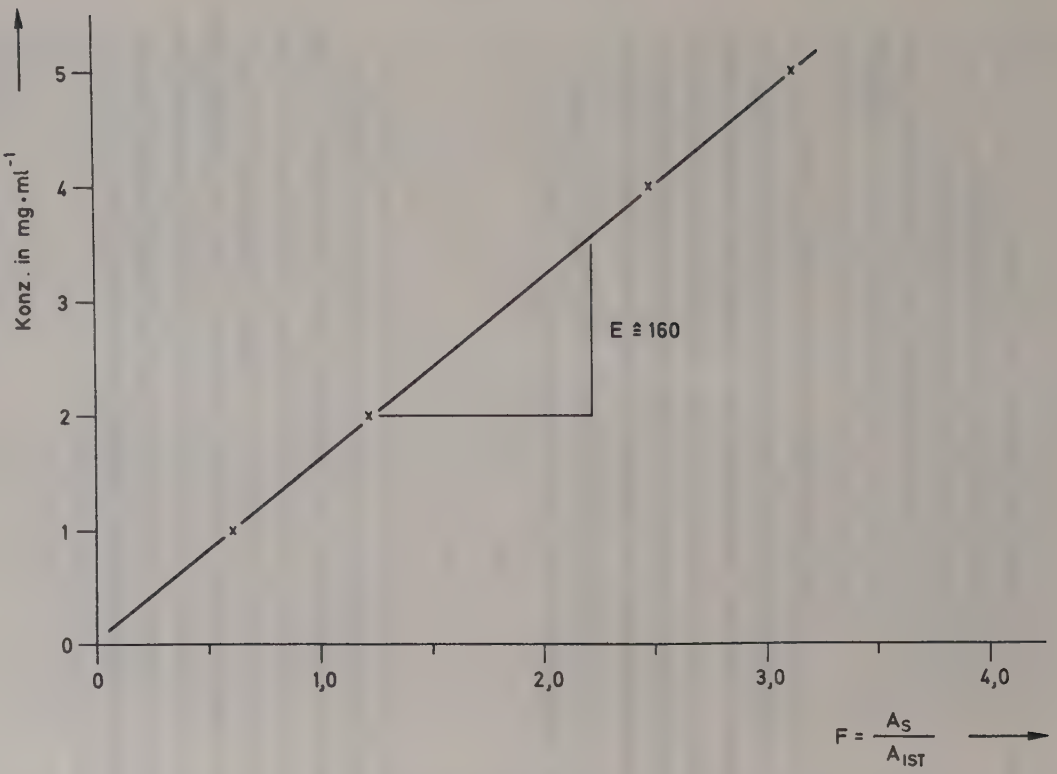


Abb. 6: Eichkurve und Faktor E zur quantitativen Bestimmung der 17-Oxo-Steroide

Die Formel für die quantitative Bestimmung der 17-Oxo-Steroide lautet nun:

$$M_S = \frac{A_S \cdot f_S}{A_{IST} \cdot f_{IST}} \cdot E \cdot 100$$

wobei M_S = Menge der gesuchten Substanz
A_S = Peakfläche der gesuchten Substanz
A_{IST} = Peakfläche des Internen Standards
f_S u. f_{IST} = substanzspezifische Korrekturfaktoren
E = der Faktor, der die Steigung der Eichkurve angibt, der die Menge des Internen Standards und die Konzentration enthält, ist.

Die substanzspezifischen Korrekturfaktoren f_S u. f_{IST} ergeben sich bei Verwendung von Flammenionisations-Detektoren in der Weise, daß gleiche Molmengen Kohlenwasserstoffe Ausschläge erzeugen, die in erster Näherung dem Kohlenstoffgehalt im Molekül proportional sind.

Die Korrekturfaktoren sind proportional dem Quotienten aus Molekulargewicht und Kohlenstoffzahl im Molekül.

$$f \sim \frac{MG}{n}$$

Nach H. Huck (29) sind diese Faktoren nur dann sehr verschieden voneinander, wenn sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Produkte stark voneinander unterscheiden. Das ist bei den verwendeten Steroiden nicht der Fall. Ebenso ist die Bodenzahl einer Trennsäule für die einzelnen Steroide konstant. Außerdem sind die Durchbruchzeiten (Gesamtretentionszeiten) der Steroide gegenüber dem Inertgas relativ groß. Daher kann als eine weitere notwendige Voraussetzung die Diffusionsverbreiterung in der Gasphase vernachlässigt werden.

Wenn die Faktoren f_S und f_{IST} nach H. Huck (19) also nahezu gleich sind,

$$\frac{MG_S \ / \ n_S}{MG_{IST} \ / \ n_{IST}} = 1$$

vereinfacht sich die oben angegebene Formel zu:

$$M_S = \frac{A_S}{A_{IST}} \cdot E \cdot 100$$

Wendet man diese Methode auf die Urine an, so kann man bei bekannter Ausscheidungsmenge des Urins pro 24 Stdn. die einzelnen Mengen der Fraktionen der 17-Oxo-Steroide mit einer Genauigkeit von $\pm$ 10% angeben.
Diese Genauigkeit reicht für die klinische Relevanz der Untersuchungen aus, um auch kleine Störungen des Hormon-Haushaltes beim Menschen zu diagnostizieren.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Säulen unter variierten Betriebsbedingungen

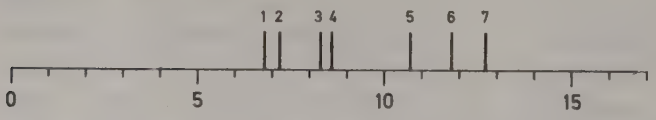
5.1.1. Säule: Silicongummi OV 1 auf Chromosorb G

5.1.1.1. Untersuchung der Einzelsubstanzen:

Tab. 6: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei GDF: 2 $kp \cdot cm^{-2}$

Säule: OV 1; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	$kp \cdot cm^{-2}$	min
1	A	0,5	280	220	260	2	6,8
2	Ä	0,5	280	220	260	2	7,2
3	DHEA	0,5	280	220	260	2	8,3
4	11-O-A	0,5	280	220	260	2	8,6
5	11-O-Ä	0,5	280	220	260	2	10,7
6	11β-OH-A	0,5	280	220	260	2	11,8
7	11β-OH-Ä	0,5	280	220	260	2	12,7



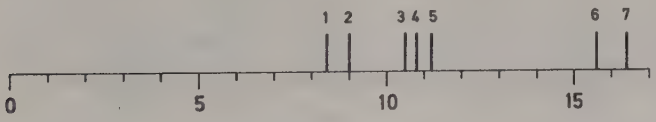
Bei diesen Bedingungen bewegen sich die Retentionszeiten zwischen 6 und 13 Minuten, mit einer für das Trennergebnis sich schlecht auswirkenden Häufung bei 8 Minuten.

Außerdem ist die Säule sehr bald überlastet, d.h. die einzelnen Retentionszeiten ändern sich im Laufe der Zeit. Hier wurde nach der Methode 1 silyliert. Diese Methode ist nicht optimal, die Substanzen zersetzen sich. Das macht sich ebenfalls in einer Änderung der Retentionszeiten bemerkbar. Die Retentionszeiten sind insgesamt recht lang, was sich negativ auf die Analysenzeit auswirkt.

Tab. 7: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei GDF: 1,5 $kp \cdot cm^{-2}$

Säule: OV 1; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	$kp \cdot cm^{-2}$	min
1	A	0,5	280	220	260	1,5	8,4
2	Ä	0,5	280	220	260	1,5	9,0
3	DHEA	0,5	280	220	260	1,5	10,5
4	11-O-A	0,5	280	220	260	1,5	10,8
5	11-O-Ä	0,5	280	220	260	1,5	11,2
6	11β-OH-A	0,5	280	220	260	1,5	15,6
7	11β-OH-Ä	0,5	280	220	260	1,5	16,4



Bei dieser Bestimmungsmethode wurde bei sonst gleichen Bedingungen nur die Gasdurchflußgeschwindigkeit etwas erniedrigt mit dem Ergebnis, daß die Trennung nur eine Kleinigkeit verbessert wird, d.h. die Retentionszeiten etwas auseinanderrücken. Insgesamt ist das jedoch so wenig, daß sich diese Bedingungsänderung auf das Trennergebnis kaum auswirkt. Die Analysenzeit wird dagegen umsomehr verlängert.

Tab. 8: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei GDF: 1 $kp \cdot cm^{-2}$

Substanz	Menge	Bedingungen					Säule	Rt-Zeit
		I°C	O°C	D°C	TG	GDF		
	µl					$kp \cdot cm^{-2}$		min
A	0,5	280	220	260	N_2	1	OV 1	12,6

Bei einer noch kleineren Gasdurchflußgeschwindigkeit ergibt sich die gleiche Tendenz. Man beobachtet wieder eine kleine Verbesserung des Trennergebnisses und es entsteht eine noch längere, inzwischen untragbar gewordene, Analysendauer.

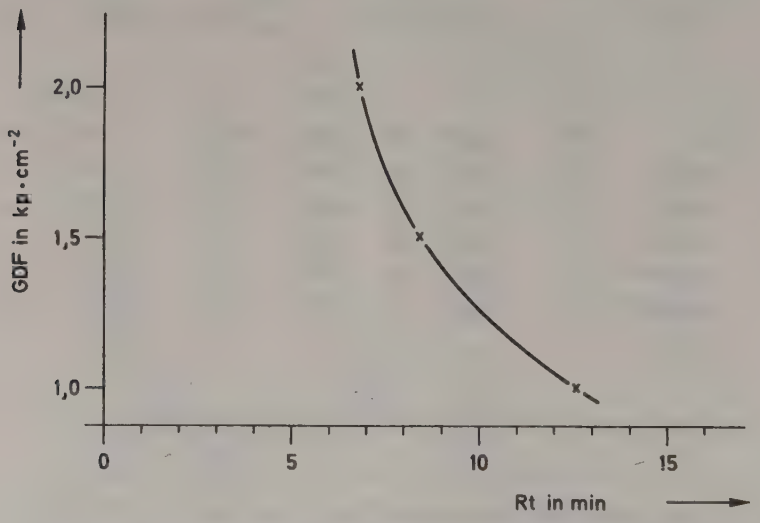


Abb. 7: Abhängigkeit der Retentionswerte des Androsteron von der Gasdurchflußgeschwindigkeit

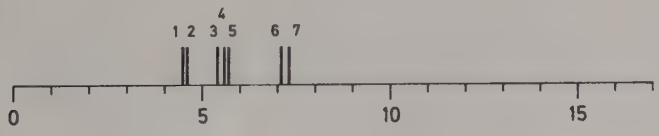
Ein Diagramm der Gasdurchflußgeschwindigkeit als Funktion der Retentionszeit beim Androsteron kann das veranschaulichen. Man sieht dabei, daß es sich hier nicht um eine lineare Abhängigkeit handelt.

Durch Verwendung einer anderen Silylierungsmethode (Methode 3) kann, wie bei der Versuchsreihe (Tab. 9) zu sehen ist, die Analysenzeit erheblich verkürzt werden. Die Analysenzeit beträgt bis 8 Minuten. Die Auftrennung ist dagegen nicht besser geworden bei sonst gleichen Bedingungen.

Tab. 9: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 220°C

Säule: OV 1; Trägergas: N_2

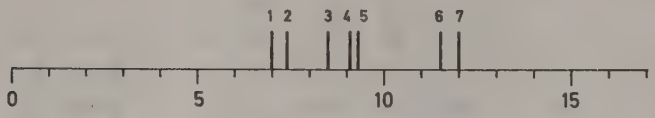
Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	220	260	1,5	4,5
2	Ä	0,2	280	220	260	1,5	4,6
3	DHEA	0,2	280	220	260	1,5	5,4
4	11-O-A	0,2	280	220	260	1,5	5,6
5	11-O-Ä	0,2	280	220	260	1,5	5,7
6	11β-OH-A	0,2	280	220	260	1,5	7,1
7	11β-OH-Ä	0,2	280	220	260	1,5	7,3



Tab. 10: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 210°C

Säule: OV 1; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	210	260	1,5	7,0
2	Ä	0,2	280	210	260	1,5	7,4
3	DHEA	0,2	280	210	260	1,5	8,5
4	11-O-A	0,2	280	210	260	1,5	9,3
5	11-O-Ä	0,2	280	210	260	1,5	9,1
6	11β-OH-A	0,2	280	210	260	1,5	11,5
7	11β-OH-Ä	0,2	280	210	260	1,5	12,0



Durch Erniedrigung der Säulenofentemperatur gelingt es ein wesentlich besseres Trennergebnis zu erzielen. Das geht bei gleicher GDF wieder auf Kosten der Analysenzeit. Es wurde die oben verwendete Silylierungsmethode 3 benutzt.

5.1.1.2. Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen

Gemische sind: im gleichen Verhältnis gemischte Reinsubstanzen.

Tab. 11: Trennergebnisse von 17-Oxo-Steroid-Gemischen bei verschiedenen Ofentemperaturen

Säule: OV 1; Trägergas: N_2

Substanz	Menge	Bedingungen				Ergebnis
		I	O	D	GDF	
	µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	
G_1	0,4	280	220	260	1,5	3-4 Peaks
G_2	0,4	280	210	260	1,5	4 Peaks (schlecht)
G_3	0,4	280	200	260	1,5	3 Peaks (schlecht)

Hierbei zeigt sich, daß die verwendete Säule bei der Aufgabe das Gemisch aus 17-Oxo-Steroiden zu trennen sehr schlechte Ergebnisse liefert.
Insgesamt bedeutet das, daß diese Trennsäule der geforderten Aufgabe nicht gerecht werden kann, da das Auflösungsvermögen zu gering ist.

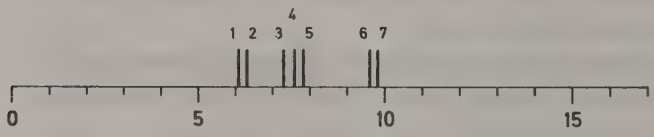
5.1.2. Säule: Silicongummi SE 30 auf Chromosorb P

5.1.2.1. Untersuchung der Einzelsubstanzen

Tab. 12: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 230°C

Säule: SE 30; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	230	260	1,5	6,1
2	Ä	0,2	280	230	260	1,5	6,3
3	DHEA	0,2	280	230	260	1,5	7,3
4	11-O-A	0,2	280	230	260	1,5	7,6
5	11-O-Ä	0,2	280	230	260	1,5	7,8
6	11β-OH-A	0,2	280	230	260	1,5	9,6
7	11β-OH-Ä	0,2	280	230	260	1,5	9,8



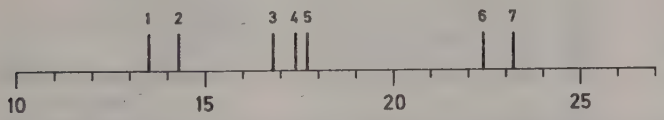
Diese Säule zeigt bei einer Ofentemperatur von 230°C eine Trennung in drei Gruppen. Die erste Gruppe enthält Androsteron und Ätiocholanolon bei einer Retentionszeit von 6 Minuten. Die zweite Gruppe besteht aus Dihydro-Epiandrosteron, 11-Oxo-Androsteron und 11-Oxo-Ätiocholanolon mit einer Retentionszeit zwischen 7 und 8 Minuten. Schließlich die dritte Gruppe, sie setzt sich zusammen aus 11β-Hydroxy-Androsteron und 11β-Hydroxy-Ätiocholanolon.

Bei dem Gemisch aus allen 17-Oxo-Steroiden bzw. bei den Urinen, würde das bedeuten, daß es drei statt sieben Peaks geben wird. Diese drei Peak-Gruppen wiederum aufzutrennen wird bei dieser Säule sehr schwierig werden.

Tab. 13: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 210°C

Säule: SE 30; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	210	260	1,5	13,5
2	Ä	0,2	280	210	260	1,5	14,3
3	DHEA	0,2	280	210	260	1,5	16,8
4	11-O-A	0,2	280	210	260	1,5	17,4
5	11-O-Ä	0,2	280	210	260	1,5	17,7
6	11β-OH-A	0,2	280	210	260	1,5	22,4
7	11β-OH-Ä	0,2	280	210	260	1,5	23,2



Eine Herabsetzung der Temperatur bei der gleichen Säule und auch sonst gleichen Bedingungen zeigt, daß die einzelnen Peaks auseinanderrücken. Die dadurch gewonnene Verbesserung der Auflösung reicht aber noch nicht aus, um die einzelnen Gruppen im ausreichenden Maße voneinander zu trennen.

5.1.2.2. Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen

Hierbei wurden die Gemische bei verschiedenen Säulenofentemperaturen gemessen.
Es ergibt sich ein Maximum der Trennleistung bei ca. 220°C Ofentemperatur. Die Einzelauftrennung ist aber trotzdem so schlecht, daß diese Säule die gestellte Aufgabe ebenfalls nicht lösen kann, vor allem, wenn es um eine quantitative Bestimmung geht.
Dazu siehe folgende Tabelle.

Tab. 14: Trennergebnisse von 17-Oxo-Steroidgemischen bei verschiedenen Ofentemperaturen

Säule: SE 30; Trägergas: N_2

Gemisch	Menge	Bedingungen				Ergebnis
		I	O	D	GDF	
	µl	°C	°C	°C	$kp \cdot cm^{-2}$	
G_1	0,3	280	240	260	2	5 Peaks
G_2	0,2	280	240	260	1,5	5 Peaks
G_3	0,3	280	230	260	1,5	6 Peaks (schlechte Trennung)
G_4	0,2	280	220	260	1,5	5 Peaks
G_5	0,5	280	210	260	1,5	5 Peaks
G_6	0,2	280	200	260	1,5	5 Peaks (sehr schlechte Trennung)
G_7	0,15	280	190	260	1,5	4 Peaks (sehr schlechte Trennung)

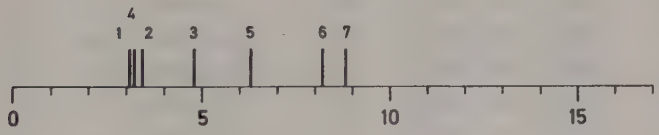
5.1.3. Säule Siliconöl OV 225 auf Chromosorb W

5.1.3.1. Untersuchung der Einzelsubstanzen

Tab. 15: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 230°C

Säule: OV 225; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,5	260	230	260	1	3,1
2	Ä	0,5	260	230	260	1	3,4
3	DHEA	0,5	260	230	260	1	4,8
4	11-O-A	0,5	260	230	260	1	3,15
5	11-O-Ä	0,5	260	230	260	1	6,3
6	11β-OH-A	0,5	260	230	260	1	8,2
7	11β-OH-Ä	0,5	260	230	260	1	8,8



Diese Säule zeigt bei den gewählten Bedingungen eine brauchbare Trennleistung. Die einzelnen Peaks besitzen in ihrer Retentionszeit einen genügend großen Abstand, um als Gemisch bzw. im Urin dann getrennt voneinander aufzutreten.

Die hierbei sehr schlechte Trennung, d.h. ein fast identischer Retentionswert für Androsteron und 11-Oxo-Androsteron wird dadurch erklärt, daß sich das 11-Oxo-Androsteron zersetzt haben muß. Es liegt entweder ein Fehler

bei der Silylierung vor, das Silylierungsprodukt war zu alt oder die Reinsubstanz war von Anfang an zersetzt.

5.1.3.2. Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen bei Variationen der Betriebsbedingungen:

Tab. 16: Trennergebnisse von 17-Oxo-Steroidgemischen bei verschiedenen Ofentemperaturen

Säule: OV 225; Trägergas: N_2

Gemisch	Menge	Bedingungen				Trennergebnis
		I	O	D	GDF	
	µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	
G_1	1	300	260	260	2	keine Auflösung
G_2	1	280	260	260	2	keine Auflösung
G_3	1	280	240	260	2	1 Peak
G_4	1	280	220	260	2	5 Peaks
G_5	1	280	200	260	2	3 Peaks
G_6	1	280	200	260	1,5	3 Peaks
G_7	0,5	260	240	260	1	5 Peaks
G_8	1	260	230	260	1	5-6 Peaks
G_9	0,5	260	230	260	0,5	3-4 Peaks
G_{10}	0,5	260	220	260	1	6 Peaks
G_{11}	1	260	200	260	1,5	6 Peaks
G_{12}	1	260	200	260	2	6 Peaks
G_{13}	0,5	260	200	260	1	1 Peak
G_{14}	1	260	180	260	1,5	2 Peaks

Diese Versuchsreihe zeigt, daß die Säule trotz großer Variationsbreite der Bedingungen und ausreichender Abstände der einzelnen Peaks eine nicht befriedigende Trennleistung bringt, da die einzelnen Peaks meist noch im Tailing des Lösungsmittelpeaks liegen.

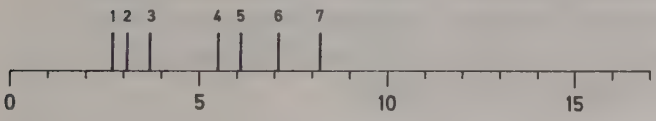
Die optimalen Bedingungen an dieser Säule wären bei 260°C Injektortemperatur, 200-210°C Säulenofentemperatur und 260°C Detektortemperatur, bei einer GDF von 1,5 kp · cm^{-2} zu suchen, dabei ist jedoch die Auflösung nicht gut. Das liegt möglicherweise an der Qualität der Säulenfüllung.

5.1.3.3. Verwendung einer neuen Säule OV 225 auf Chromosorb W

Tab. 17: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 233°C

Säule: OV 225; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,4	275	233	270	1,5	2,7
2	Ä	0,4	275	233	270	1,5	3,1
3	DHEA	0,4	275	233	270	1,5	3,7
4	11-O-A	0,4	275	233	270	1,5	5,5
5	11-O-Ä	0,4	275	233	270	1,5	6,1
6	11β-OH-A	0,4	275	233	270	1,5	7,05
7	11β-OH-Ä	0,4	275	233	270	1,5	8,2



Durch Verwendung einer neuen Säule bei ähnlichen Bedingungen bekommt man eine sehr gute Trennung der Reinsubstanzen. Wegen der geringen Peakbreite und des geringen Tailings erhält man auch an Gemischen und Urinen sehr gute Trennergebnisse. Eine quantitative Auswertung ist ebensogut möglich.

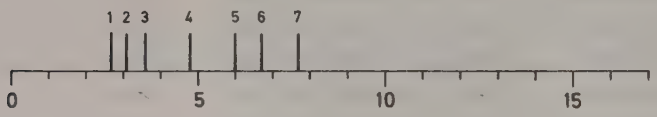
5.1.4. Säule: Nitrilsiliconöl XE 60 auf Chromosorb P 3%ige Belegung

5.1.4.1. Untersuchung der Einzelsubstanzen

Tab. 18: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 225°C

Säule: XE 60; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	225	260	2	2,7
2	Ä	0,2	280	225	260	2	3,1
3	DHEA	0,2	280	225	260	2	3,6
4	11-O-A	0,2	280	225	260	2	4,8
5	11-O-Ä	0,2	280	225	260	2	6,0
6	11β-OH-A	0,2	280	225	260	2	6,7
7	11β-OH-Ä	0,2	280	225	260	2	7,7

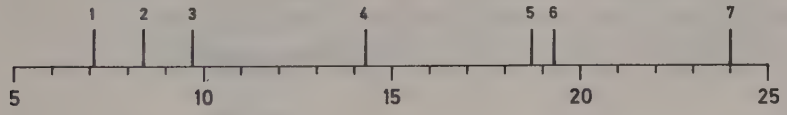


Bei diesen Bedingungen zeigt sich eine gute Trennung der einzelnen Steroide. Besonders bei den ersten drei Substanzen könnte z.B. durch Erniedrigung der Temperatur eine weitere Verbesserung erzielt werden.

Tab. 19: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei GDF: 2 kp · cm^{-2}

Säule: XE 60; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	1	260	200	260	2	7,1
2	Ä	1	260	200	260	2	8,4
3	DHEA	1	260	200	260	2	9,7
4	11-O-A	1	260	200	260	2	14,3
5	11-O-Ä	1	260	200	260	2	18,7
6	11β-OH-A	1	260	200	260	2	19,3
7	11β-OH-Ä	1	260	200	260	2	24,2

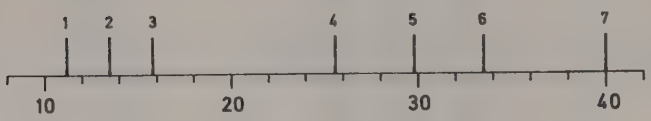


Die Rt-Zeiten rücken auseinander, die Trennleistung verbessert sich. Da gleichzeitig auch die Injektortemperatur reduziert wurde, wird die Analysenzeit zu lang.

Tab. 20: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei GDF: 1,5 kp · cm^{-2}

Säule: XE 60; Trägergas: N_2

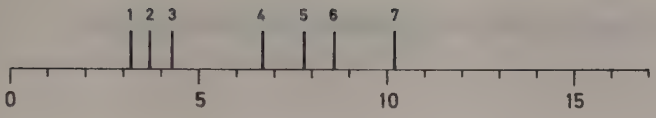
Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	200	260	1,5	11,4
2	Ä	0,2	280	200	260	1,5	13,5
3	DHEA	0,2	280	200	260	1,5	15,8
4	11-O-A	0,2	280	200	260	1,5	25,6
5	11-O-Ä	0,2	280	200	260	1,5	29,8
6	11β-OH-A	0,2	280	200	260	1,5	33,5
7	11β-OH-Ä	0,2	280	200	260	1,5	40,5



Tab. 21: Übersicht der Retentionswerte der einzelnen 17-Oxo-Steroide bei einer Ofentemperatur von 210°C

Säule: XE 60; Trägergas: N_2

Bez.	Substanz	Menge	Bedingungen				Rt-Zeit
			I	O	D	GDF	
		µl	°C	°C	°C	kp · cm^{-2}	min
1	A	0,2	280	210	260	2	3,2
2	Ä	0,2	280	210	260	2	3,7
3	DHEA	0,2	280	210	260	2	4,3
4	11-O-A	0,2	280	210	260	2	6,7
5	11-O-Ä	0,2	280	210	260	2	7,8
6	11β-OH-A	0,2	280	210	260	2	8,6
7	11β-OH-Ä	0,2	280	210	260	2	10,2



Die Reduzierung der Ofentemperatur ergibt eine Verbesserung, die aber durch eine gleichzeitige Reduzierung der GDF sehr lange Analysenzeiten mit sich bringt. Entscheidend für die Trennleistung und die Analysenzeit ist deshalb die richtige Wahl der Ofentemperatur.

Bei den Bedingungen, die in Tab. 21 gewählt wurden, ist die Trennleistung als sehr gut zu bezeichnen und die Analysenzeiten noch in gut möglichem Rahmen.

5.1.4.2. Untersuchung von Gemischen der Standardsubstanzen bei Variationen der Betriebsbedingungen:

Tab. 22: Trennergebnisse von 17-Oxo-Steroidgemischen bei verschiedenen Ofentemperaturen und Gasdurchflußgeschwindigkeiten

Säule: XE 60; Trägergas: N_2

Gemisch	Menge	Bedingungen					Säule	Trennergebnis
		I	O	D	TG	GDF		
	µl	°C	°C	°C		kp · cm^{-2}		
G_1	0,2	280	225	260	N_2	2	XE 60	gute Auflösung
G_2	0,2	280	210	260	N_2	1,5	XE 60	sehr gute Auflösung, gute Rt-Zeit
G_3	0,2	280	200	260	N_2	1,5	XE 60	sehr gute Auflösung zu breite Peaks zu lange Rt-Zeit
G_4	1	260	200	260	N_2	2	XE 60	mäßige Auflösung

Auch hier zeigen sich gute Ergebnisse bei den oben genannten Idealbedingungen.

5.1.4.3. Chromatogramme von Untersuchungen an Urinen

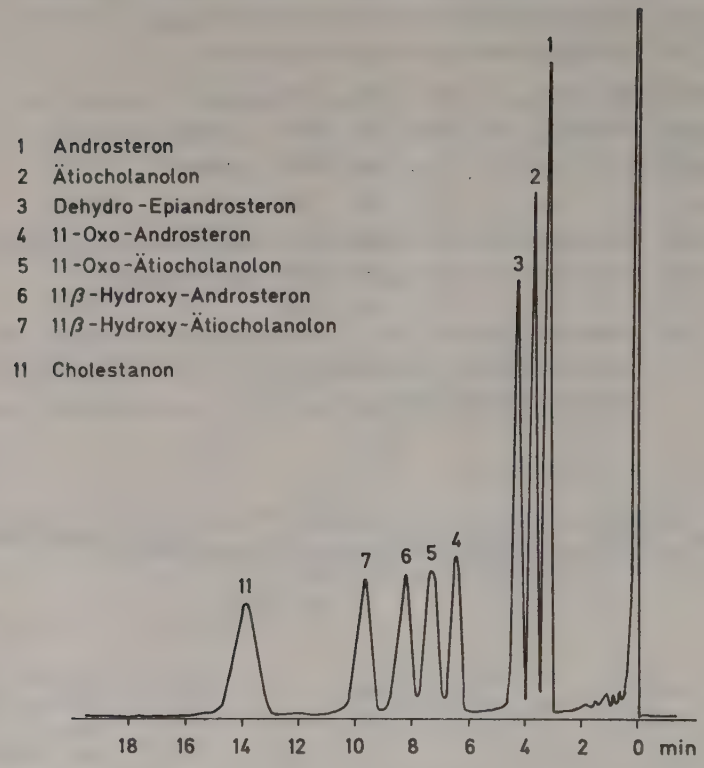


Abb. 8: 17-Oxo-Steroid-Chromatogramm von Standardsubstanzen (TMSi-Derivat, XE 60, Säulenofentemperatur 210°C)

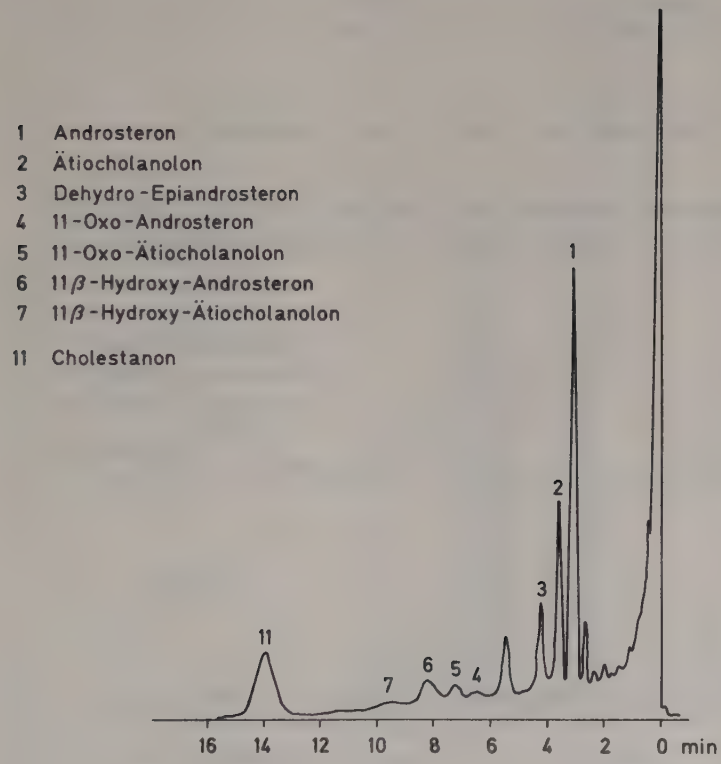


Abb. 9: 17-Oxo-Steroid-Chromatogramm eines Urines
(TMSi-Derivat, XE 60, Säulenofentemperatur 210°C)

5.2. Ergebnisse der Untersuchungen an Urinen von Patienten im Vergleich zur herkömmlichen photometrischen Bestimmung

Diese Untersuchungen wurden mit den Säulen OV 225 und XE 60 bei den folgenden Bedingungen durchgeführt.

Säule	Temperatur			TG	GDF
	$r^{\circ}C$	$o^{\circ}C$	$D^{\circ}C$		$kp \cdot cm^{-2}$
XE 60	280	210	260	N_2	1,5 $\hat{=}$ 45 $ml \cdot min^{-1}$
OV 225	275	233	270	N_2	1,5 $\hat{=}$ 45 $ml \cdot min^{-1}$

Es wurden im Vergleich 16 Urine von Patienten untersucht und die Ergebnisse in Tabelle 22 gegenübergestellt.

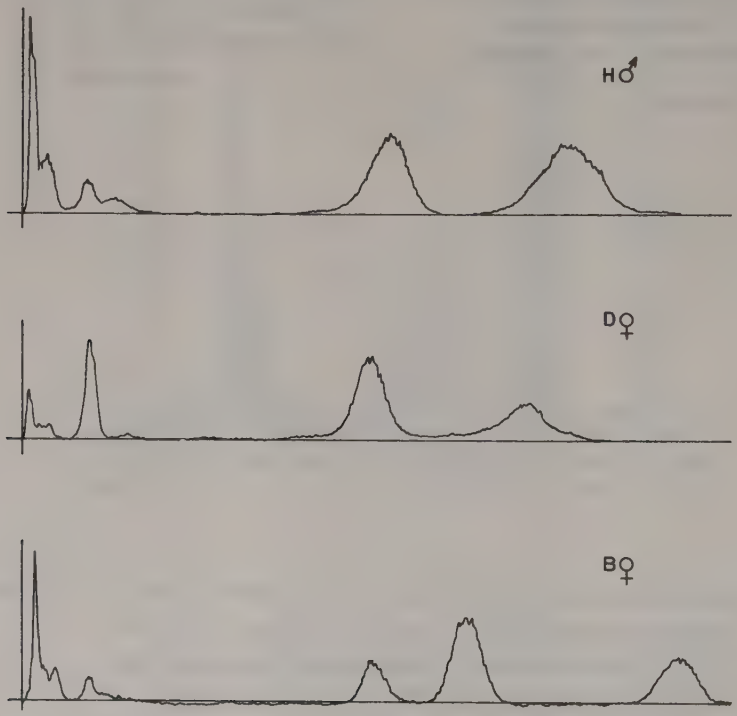


Abb. 10: Beispiel einer photometrischen Auswertung

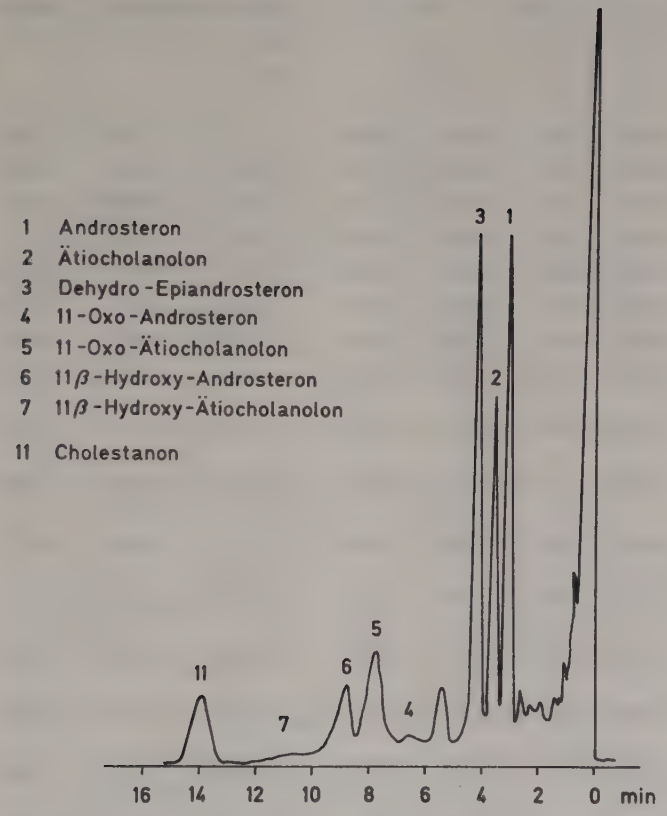


Abb. 11: 17-Oxo-Steroid-Chromatogramm vom Urin eines Patienten

Tab. 23: Individuelle Ergebnisse der absoluten 17-Oxo-Steroid-Ausscheidungsmengen

Name ♀ ♂ Nr.		Androsteron		Ätiocholanolon		Dehydro-Epiandrosteron		11-Oxo-Andro-
		GC %	P %	GC %	P %	GC %	P %	GC %
F.E.	♀	18,23	23,37	49,20	52,84	-	-	1,50
H.L.	♂	18,21	12,30	11,27	15,04	56,33	52,46	0,90
M.W.	♀	27,38	23,08	47,82	52,41	11,07	12,78	1,57
G.S.	♂	38,29	36,18	40,63	41,38	2,65	4,00	0,35
U.B.	♀	22,07	23,97	30,42	34,70	17,26	17,81	1,18
N.M.	♀	27,69	33,41	40,80	42,69	9,31	5,80	1,20
A.W.	♀	28,58	31,49	33,64	45,56	4,62	3,18	0,05
P.S. 6569	♂	26,68	30,64	24,43	42,22	3,13	1,52	1,32
A.H. 6576	♀	44,27	45,68	27,73	30,43	2,67	1,50	0,50
M.E. 6584	♀	21,09	24,78	34,78	42,38	11,29	12,94	1,00
C.C. 6723	♂	21,23	17,70	27,28	36,70	25,54	27,41	0,49
K.S. 6721	♀	30,55	30,52	25,82	34,35	21,52	21,99	2,87
S.El B. 6716	♀	41,32	18,92	26,57	34,19	17,26	15,07	1,50
A.M. 6725	♀	27,20	24,56	24,57	29,22	26,90	31,06	0,80
W.S. 6737	♂	46,78	35,92	23,12	24,80	11,09	9,24	2,12
J.E. 6732	♀	39,70	49,48	31,79	34,46	8,13	7,70	0,50

Vergleich der gaschromatografisch und papierchromatografisch gewonnenen Einzelergebnisse

	11-Oxo-Ätiocholanolon		11β-Hydroxy-Androsteron		11β-Hydroxy-Ätiocholanolon		Ausscheidungsmenge
steron							
P %	GC %	P %	GC %	P %	GC %	P %	mg · die^{-1}
2,87	8,40	12,49	3,60	3,85	10,50	5,08	15,93
0,96	3,70	8,90	3,20	4,14	2,96	4,59	15,99
1,30	3,46	3,78	2,00	3,91	0,60	1,30	6,45
2,27	9,12	7,47	1,78	6,54	0,35	2,13	18,00
2,97	7,55	7,99	3,27	4,57	2,26	2,74	12,95
0,61	9,20	5,72	2,20	5,50	5,10	6,18	14,40
1,84	2,99	10,55	7,76	2,17	1,91	2,68	5,97
1,20	2,28	1,44	10,18	11,82	1,01	4,22	8,30
0,66	1,71	8,15	11,04	9,48	2,14	3,98	10,55
2,66	1,44	8,35	4,72	2,88	2,30	3,92	13,52
1,87	2,52	5,15	13,15	12,50	0,55	0,70	10,78
1,75	1,00	4,04	4,78	5,14	2,10	2,19	9,12
1,60	3,52	6,96	3,91	15,28	1,80	7,90	9,61
2,09	3,24	6,04	5,62	4,59	2,33	2,44	13,07
1,54	4,34	13,43	8,27	7,07	1,50	6,16	11,70
0,90	3,63	3,00	9,02	2,35	2,12	1,43	7,65

6. Diskussion

6.1. Die Notwendigkeit der Fraktionierung von 17-Oxo-Steroiden

Um die Notwendigkeit der Fraktionierung der 17-Oxo-Steroide zu erkennen, sei an einem vereinfachten Schema ihre Entstehung und ihr Erscheinen im Urin gezeigt (siehe Abb. 12, S. 55).

In diesem komplizierten Entstehungsmechanismus der Glucocorticoide sind natürlich viele Störungsmöglichkeiten, sog. Enzymdefekte, wahrscheinlich. Ist die Synthese zu den Glucocorticoiden auf Grund eines Enzymmangels nicht möglich, so entstehen unabhängig vom Enzymdefekt Androgene. Bei der Untersuchung des Urins eines Patienten mit einem Enzymdefekt zeigt sich eine erhöhte Ausscheidung von 17-Oxo-Steroiden. Die Differenzierung bzw die Erkennung des Enzymdefektes ist nur nach Bestimmung der Einzelmetabolite möglich.

Klinisch zeigt sich bei einem Drittel der betroffenen Patienten eine Virilisierung und ein starker Salzverlust. Die häufigste Enzymdefekte sind:

1. 3β-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase-Mangel:
   Man findet im Harn des Patienten neben vermehrter Ausscheidung an Pregnandiol und Pregnantriol vor allem große Mengen an Δ^5 Steroiden.
2. 21-Hydroxylase-Mangel: Der Harn des Patienten enthält stark vermehrt Pregnantriol und Pregnandiol, Pregnantriolon, außerdem stark vermehrte 17-Oxo-Steroide.
3. 11β-Hydroxylase-Mangel: Man erkennt ihn im Urin des Patienten am vermehrten Auftreten von Androsteron, besonders aber von Ätiocholanolon und dem Fehlen der 11β-Hydroxy- und 11-Oxo-Verbindungen. Es ist eine zusätzlich erhöhte Ausscheidung von Tetrahydro-11-Desoxicorticosteron zu beobachten.

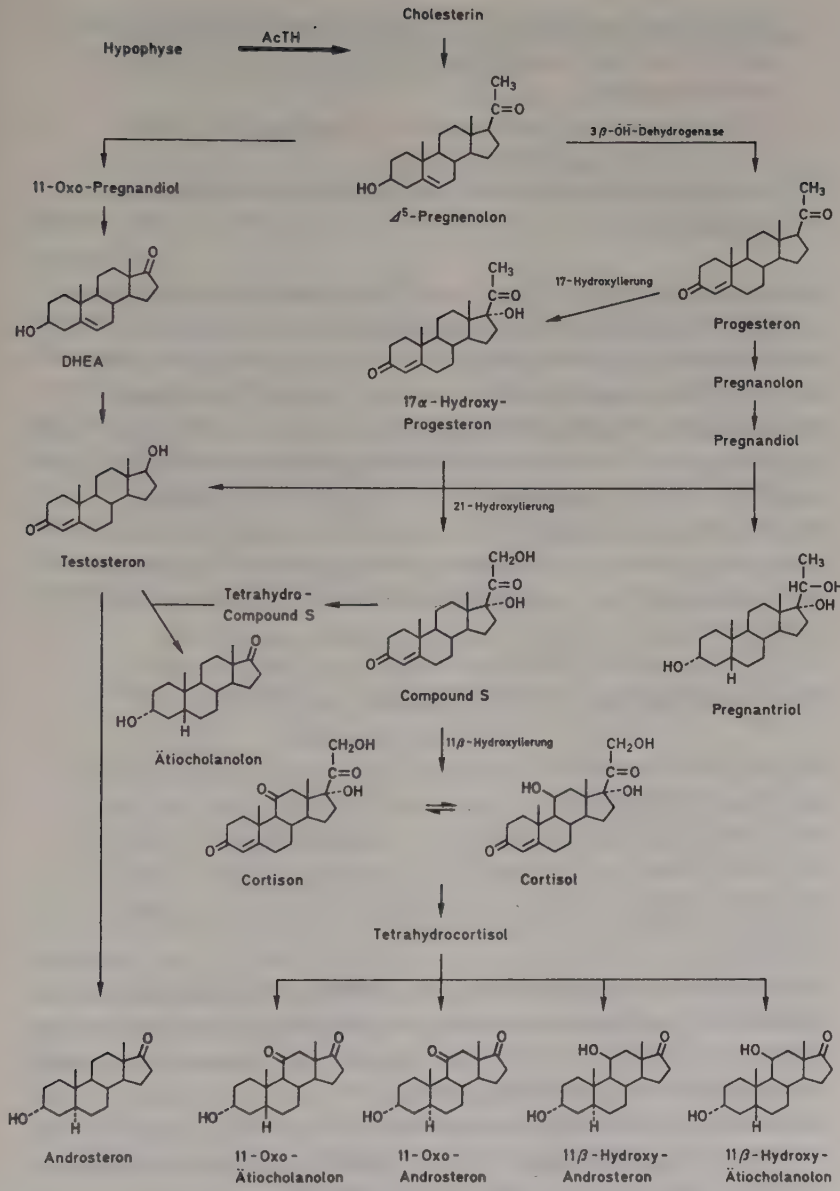


Abb. 12: Vereinfachtes Schema des Steroidmetabolismus

4. 18-Hydroxylase-Defekt: Tritt sehr selten auf und betrifft nur die Aldosteronbildung.
5. 19-Hydroxylase:
   a) Unterfunktion bedingt das Auftreten von Testosteron im weiblichen Harn.
   b) Überfunktion bedingt eine testikuläre Feminisierung.

Man erkennt deutlich, daß durch die fraktionierte Bestimmung der 17-Oxo-Steroide eine Differenzierung der verschiedenen Enzymdefekte möglich wird. Diese Enzymdefekte spielen eine große Rolle beim Hirsutismus, Adrenogenitalen Syndrom, Morbus Addison, Morbus Cushing, Nebennierenrindencarzinom, bei Funktionsstörungen der Gonaden usw. (9) Dadurch wird es notwendig, durch geeignete Methoden, wie sie das beschriebene Verfahren darstellt, die Fraktionierung der 17-Oxo-Steroide zu erreichen, um dadurch der Diagnostik bei der Erkennung von Enzymdefekten und endokrinen Erkrankungen behilflich sein zu können.

6.2. Untersuchung an verschiedenen Säulen

Aus den durchgeführten Untersuchungen ergibt sich, daß sowohl die Säule XE 60 als auch die Säule OV 225 bei den oben genannten Bedingungen gute Trennergebnisse liefert. Man kann beide Säulentypen zur qualitativen und zur quantitativen Bestimmung der 17-Oxo-Steroide im Urin heranziehen.

Beide Säulenfüllungsmaterialien sind im gleichen Maße geeignet die geforderte Aufgabe zu erfüllen. Dabei ist zu bedenken, daß die Säule OV 225 schnell zur Überlastung neigt und eine öftere Ausheizung nötig wird.
Andererseits sollte eine Ausheizung der Säulen sowieso regelmäßig in geeigneten Abständen erfolgen, um immer gute und zuverlässige Analysenwerte zu erhalten.

6.3. Genauigkeit und Wiederfindungsrate der entwickelten gaschromatografischen Methode

6.3.1. Durchführung:

Nach der Hydrolyse mit β-Glucuronidase werden zu vier Urinproben von je 300 ml 10 µl [7-^{3}H(N)] Dehydro-Epiandrosteron zugesetzt.
Diese 10 µl enthalten 0,00035 µg [7-^{3}H(N)] DHA = 0,025 µCi
Während des unter 4.1. beschriebenen Arbeitsganges wurde die Nichtketonfraktion mittels Girard-Trennung abgetrennt. Der gewonnene Extrakt, der die 17-Oxo-Steroide enthält, wurde nun in 200 µl Äthanol gelöst. Davon wurden 100 µl in ein Zählfläschchen gegeben (Countzahl mal 2).
Vor der 17-Oxo-Steroid-Gesamtbestimmung wird die zweite Messung angesetzt:
Vom in 4 ml gelösten Extrakt werden 0,1 ml abgenommen (Countzahl mal 40) und dann gezählt.

6.3.2. Ergebnis der prozentualen Wiederauffindung nach Zusatz von 10 µl [7-^{3}H(N)] DHA (0,35 ng , 0,025 µCi)

Probe	17-Oxo-Steroide
1.	50,06
2.	49,80
3.	50,97
4.	57,54

Man erkennt deutlich, daß schon bevor die fraktionierte Auftrennung der 17-Oxo-Steroide vorgenommen wird, die Wiederauffindungsrate bei Urinen ca. 50% beträgt. Das kann durch den komplizierten Aufarbeitungsprozess, den die Aufbereitung der 17-Oxo-Steroide aus dem Urin mit sich bringt, leicht erklärt werden. Durch öfteres Überführen in verschiedene Phasen, Emulgierungen, Filtrationen und verschiedene Auswaschprozesse, wird dieser Verlust zustande gebracht.

Die eventuellen Fehler, die dann in der anschließenden Fraktionierung im Gaschromatografen erfolgen könnten, werden eliminiert, da die Auswertung der Ergebnisse durch eine Eichkurve erfolgt. Diese wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Analyse erstellt. Außerdem unterliegt der in der Routinebestimmung immer enthaltene Interne Standard ebenfalls den Analysenbedingungen der zu messenden Probe. Die Berechnung erfolgt in Relation zum Internen Standard, sodaß mit einer Wiederfindungsrate in diesem Teil des Analysenganges mit nahezu 100% zu rechnen ist.

Der im ersten Teil der Analyse, in der Aufbereitung, entstandene Verlust, kann insofern vernachlässigt werden, da die Normalwerte (Urinmessungen von Patienten, bei denen die 17-Oxo-Steroidausscheidung sich im Normbereich befindet) ebenfalls mit dieser Aufbereitungsmethode erhalten wurden.

6.4. Vergleich der quantitativen Ergebnisse beider Verfahren

Aus der Gegenüberstellung der beiden Untersuchungen (Tab. 23) wird deutlich, daß bis auf einige wenige Fälle gute Übereinstimmung bei den Werten für Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydro-Epiandrosteron erzielt werden konnte. Bei 11-Oxo-Androsteron, 11-Oxo-Ätiocholanolon, 11β-Hydroxy-Androsteron und 11β-Hydroxy-Ätiocholanolon gibt es größere Abweichungen. Vor allem fällt auf, daß die papierchromatografisch-photometrische Methode in der Regel höhere Werte angibt. Der Grund liegt darin, daß bei der Auswertung der photometrisch gemessenen Kurven die nicht so scharf abgrenzbaren Peaks gegenüber der Gaschromatografie wesentlich größere Fehlermöglichkeiten enthalten.

Als weitere Fehlermöglichkeit bei dieser gaschromatografischen Bestimmungsmethode muß noch angeführt werden, daß die Untersuchungen an Proben durchgeführt wurden, die nach

der papierchromatografisch-photometrischen Bestimmungsmethode übrigblieben und dadurch in den jeweiligen Mengen großen Schwankungen unterlegen waren.
Es ist daher zu erwarten, daß durch das Ersetzen der Papierchromatografie und photometrischen Auswertung durch die Gaschromatografie nicht nur ein großer Zeitgewinn und geringerer Aufwand erzielt werden kann, sondern auch eine Erhöhung der Meßgenauigkeit.

6.5. Vergleich mit anderen Autoren

Es gibt eine Reihe von Autoren, die eine Trennung der 17-Oxo-Steroide auf gaschromatografischem Wege beschrieben haben, als freie Komponenten (COOPER u. CREECH 1961, HAAHTI et. al. 1961, SPARAGANA et. al. 1962, De PAOLI et. al. 1963), als Trifluoracetate (Van den HEUVEL et. al. 1962) und als Trimethylsilyäther (Van den HEUVEL et. al. 1962, HARTMAN u. WOTIZ 1963, KIRSCHNER und LIPSETT 1963, FRANCE et. al. 1965, CURTIUS u. MÜLLER 1969), um nur einige zu nennen, aber auch als Äthylenthioketalderivate (ZMIGROD u. LINDNER 1966).

Die meisten von ihnen gewannen die 17-Oxo-Steroide aus dem Urin mittels der enzymatischen Spaltung durch die β-Glucuronidase oder saure Hydrolyse. Gleispach (11) konnte jedoch nachweisen, daß die saure Hydrolyse mit sehr starker Zersetzung der 17-Oxo-Steroide verbunden ist und deshalb zu sehr hohen Fehlerwerten führt.

Manche Autoren strebten eine säulenchromatografische Vorreinigung an (Adlerkreuz), während andere wiederum sogar auf die Girard-Trennung verzichteten und die 17-Oxo-Steroide direkt nach der Hydrolyse des Urins bestimmten. (27)
Ebenso wurde die Anwendung von verschiedenen Chromatografiesäulen beschrieben, wobei als bevorzugteste Säule die XE 60 verwendet wurde.

Es muß aber auch gesagt werden, daß die meisten Arbeitsgruppen sich auf die Trennung der wichtigsten 17-Oxo-Steroide, wie Androsteron, Ätiocholanolon und Dehydro-Epiandrosteron, beschränkten. Nur wenige dehnten die Analyse auf alle sieben 17-Oxo-Steroide aus. Die Autoren Curtius u. Müller, Matthijssen u. Goldzieher, van de Calseyde et. al., R. Chevins et. al. und Külpmann u. Breuer (4-6, 25 u. 28) seien hier angeführt.

Curtius und Müller zeigten in ihrer Arbeit (6), daß sich die Glucuronidase zur Hydrolyse des Urins am besten zur franktionierten Bestimmung der 17-Oxo-Steroide eignet.

Charles Matthijssen und Joseph W. Goldzieher (28) verglichen die verschiedenen Hydrolyse-Methoden, dazu verwendeten sie ebenfalls die Girard-Trennung und die Derivatisierung in Silyläther der 17-Oxo-Steroide. Außerdem beschrieben sie die Dünnschichtchromatografie, hoben aber die höhere Genauigkeit und den geringen Aufwand der gaschromatografischen Fraktionierung hervor. Als GC-Säule verwendeten sie die XE 60, bei Bedingungen, die dem zur Verfügung stehenden Analysenapparat das beste Ergebnis abverlangt. Die dort enthaltenen Resultate sind mit denen dieser Arbeit vergleichbar.
Ebenso zeigt die Arbeit von J.E. van de Calseyde et. al. (4) eine Methode, die der oben beschriebenen Methode im Sinne der qualitativen Auftrennung nahe kommt. Es kommt dort die Säule OV 17 und OV 225 zur Anwendung. Allerdings werden wesentlich mehr Steroide aufgetrennt, was eine Verringerung der Trennqualität im Sinne der Quantifizierung zur Folge hat. Angaben zur quantitativen Auswertung werden nicht gemacht.
Auch R. Chevins et. al. (5) und R. Külpmann u. H. Breuer (25) geben gute Methoden an, um eine Franktionierung und quantitative Auswertung der 17-Oxo-Steroide zu erzielen. Die Ergebnisse sind denen dieser Arbeit sehr ähnlich, auch in quantitativer Hinsicht und im Sinne einer Routinebestimmungsmethode.

Die vorliegende Arbeit sollte vor allem eine Methode beschreiben, die sich in der täglichen Routinebestimmung der 17-Oxo-Steroidfraktionierung bewährt. Sie stellt eine Bereicherung der bisher in diesem Sinne beschriebenen Methoden dar und zeigt zudem einen Vergleich mit dem bislang geübten und bewährten Verfahren der papierchromatografischen Fraktionierung. Es werden aber auch alle Teilverfahren verwendet, die in der Literatur als erfolgversprechend zum Ziele der qualitativen und vor allem quantitativen Auftrennung führen. Im Sinne der Aufgabenstellung wurden sie variiert bzw. erweitert, um so das bestmöglichste Ergebnis zu erzielen.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde, wie es in der Aufgabenstellung gefordert war, ein Routineverfahren entwickelt zur fraktionierten Auftrennung der 17-Oxo-Steroide im menschlichen Urin, sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht.
Zwei Gaschromatografiesäulen: XE 60 und OV 225 haben sich als geeignet erwiesen vergleichbare Ergebnisse zu dem bisher geübten papierchromatografisch-photometrischen Verfahren zu erzielen. Das zeitraubende und aufwendige Verfahren der Papierchromatografie - Photometrie kann demnach durch die gaschromatografische Bestimmungsmethode abgelöst werden.

Außerdem wird eine gleichzeitige Bestimmung des Pregnandiols und Pregnantriols möglich.

Eine spätere Vollautomatisierung dieser Bestimmungsmethode kann nach den erhaltenen Ergebnissen erfolgen, da es Möglichkeiten der automatischen Probenaufgabe und ebenso automatischen Chromatogrammauswertungsanlagen (Integratoren) gibt, wie sie auch schon in dieser Arbeit verwendet wurden. Durch einen angeschlossenen Rechner wird dann die Möglichkeit geschaffen, die Ergebnisse direkt abzulesen.

8. Literaturverzeichnis

1.) Arbeitsanleitung zur papierchromatografischen Bestimmung der 17-Oxosteroide im Urin, Universitäts-Poli-Klinik für Innere Medizin Tübingen

2.) BERGER, H., M. FINK, H.J. FRITZ, H. GLEISPACH, P. HEIDEMANN and J. WOLF: Z. Clin. Chem. u. Clin. Biochem. 4, 354 (1970)

3.) BUSH, I.E.: Biochem. J. 50, 370 (1962)

4.) van de CALSEYDE, J.E., R.J.H. SCHOLTIS, N.A. SCHMIDT and C.J.J.A. LEIJTEN: Clin. Chim. Acta, 38, 103-111, (1972)

5.) CHEVINS, R., J.M. LAUNAY, R. JULIEN et C. DREUX: Clinica Chimica Acta, 55, 333-343 (1974)

6.) CURTIUS, H.-Ch. and A. MÜLLER: J. Chromatog. 30, 410 (1967)

7.) ENGELHARDT, H.: Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975

8.) FANTL, V. and C.H. GRAY: Clin. Chim. Acta 79, 237 (1977)

9.) GLEISPACH, H.: Gaschromatographische Bestimmung von Steroidhormonen aus dem Harn, Angew. Gaschromatogr. der Perkin-Elmer & Co. GmbH. 12, 12, (1969)

10.) GLEISPACH, H.: Gaschromatographische Bestimmung von Steroidhormonen aus dem Harn, Angew. Gaschromatogr. der Perkin-Elmer & Co GmbH. 12, 13, (1969)

11.) GLEISPACH, H., B. PODOLSKI, W. HOHENWALLNER u. H. BERGER: Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7. Jahrg. 1969/Heft 6

12.) GÖBEL, P. and J. CYRAN: Endokrinolgie 54, 374 (1969)

13.) GUPTA, D. and H. BUTLER: Steroids 14, 343 (1969)

14.) GUPTA, D. and W. MARSHALL: Acta Endocrinol. 68, 141 (1971)

15.) HADDEN, N., F. BAUMANN, F. Mc DONALD, M. MUNK, R. STEVENSON, D. GERE, F. ZAMARONI and R. MAJORS: Basic Liquid Chromatography, Varian Aerograph, Walnut Creek 1972

16.) HEIDEMANN, P., G. DAXENBICHLER und H. GLEISPACH: Methoden zur Stabilisierung von Steroiden für die gaschromatographische Bestimmung. Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, 439 (1970)

17.) HOBKIRK, R. and A. METCALFE-GIBSON, in D. SELIGSON (Eds).: Standard Methods of Clinical Chemistry, 4, Academic Press Inc., New York and London, 1963 , p. 65

18.) HORNING, E.C., C.J.W. BROOKS, E. CHAMBAZ, W.L. GARDINER and L. JOHNON, in F. POLVANI, M. SURACE and M. LUISI (Eds): Gas Chromatographic Determination of Hormonal Steroids, Academic Press, New York, 1967 , p. 1

19.) HUCK, H.: Das Produkt aus Druchbruchszeit und Peakhöhe als Mengenmaß bei der gaschromatographischen Bestimmung von Steroiden. J. Chromatogr., 62, 47-52, (1971)

20.) KAISER, R.: Chromatographie in der Gasphase, 1. Teil, Bibliographisches Institut Mannheim 22/22a, 127, (1965)

21.) KAISER, R.: Chromatographie in der Gasphase, 1. Teil, Bibliographisches Institut Mannheim 22/22a, 145 (1965)

22.) van KAMPEN, E.J. and A.P. ANKER: Clin. Chim. Acta 34, 241 (1971)

23.) KIRSCHNER, M.A., M.B. LIPSETT and D.R. COLLINS: J. Gas Chromatog., 2, 349 (1964)

24.) KROMAN, H.S., M.L. MOSKOVITZ, S.R. BENDER and A.N. BREST: J. Gas Chromatog., 4, 147 (1966)

25.) KÜLPMANN, W.R. and H. BREUER: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 225 (1977)

26.) KUSCHAK, D. und G. STURM: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 375 (1976)

27.) LEHNERT, G., W. MÜCKE und H. VALENTIN: Endokrinologie Bd. 46, Heft 5/6 (1964)

28.) MATTHIJSSEN, Charles and Joseph W. GOLDZIEHER: Acta Endocrinologica 68, 311-333 (1971)

29.) PERKIN-ELMER: G C Säulenliste 1001 (1977)

30.) PFAFFENBERGER, C.D. and E.C. HARNING: J. Chromatog. 122, 581 (1975)

31.) RAHMAN, M.: Clin. Chim. Acta 51, 233 (1974)

32.) ZAFFARONI, A., R.B. BURTON, E.H. KEUTMANN: Science 111, 6 (1950)

33.) ZIMMERMANN, H.: Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1955

34.) ZIMMERMANN, H., W. STAIB, H. PELZER: Klin. Wschr. 36, 982 (1958)

Lebenslauf

Am 21.6.1945 wurde ich, Christoph v. Chamier-Glisczinski, als dritter Sohn des Exportleiters Jobst v. Chamier-Glisczinski und seiner Ehefrau Gerta, geborene Gräfin v. Arnim, in Regensburg geboren. Am 20.12.1949 verstarb meine Mutter. 1952 heiratete mein Vater wieder.

Von September 1951 bis Juli 1958 besuchte ich die Volksschule in Waldkraiburg. Im September 1958 trat ich in die Waldkraiburger Realschule über und schloß dort im Juli 1962 mit der Mittleren Reife ab.

Im September 1962 begann ich meine Lehre als Laborwerker in der Firma Nitrochemie GmbH., Werk Aschau. Im August 1964 bestand ich die Prüfung als Laborwerker in der Wacker-Werksberufsschule Burghausen. Eineinhalb Jahre später legte ich an der gleichen Schule die Laborantenprüfung vor der Industrie- und Handelskammer ab.

Die Aufnahmeprüfung an der Naturwissenschaftlich-technischen-Akademie Prof. Dr. Grübler in Isny/Allg. bestand ich im April 1966. Im Juli 1967 unterzog ich mich dem Vorexamen und legte im Januar 1969 die schriftliche Prüfung des Ingenieurexamens ab. Anschließend folgte die Ingenieurarbeit am Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. Am 31.5.1969 war dann meine Ausbildung zum Ingenieur grad. der Chemie beendet.

Am 5.7.1969 heiratete ich Fräulein Gertraud Mantel, Tochter des Allgemeinarztes Dr. med. Eugen Mantel aus Schonungen am Main bei Schweinfurt.

Bei der Firma C.H. Knorr GmbH., Nahrungsmittelfabriken in Heilbronn/Neckar arbeitete ich vom 1.8.1969 bis 31.3.1971 als Chemieingenieur im dortigen Forschungslabor.

Im Sommersemester 1971 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.

Dort immatrikulierte ich mich am 18.4.1972 im Fach Medizin, schloß am 5.3.1973 das Studium der Chemie mit dem Vordiplom ab und legte am 6.4.1973 die naturwissenschaftliche Vorprüfung der Medizin ab. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich am 2.4.1974 und begann den klinischen Teil des Medizinstudiums.

Den ersten Teil der ärztlichen Prüfung absolvierte ich am 16.9.1975, den zweiten Teil am 19.4.1977. Nach dem praktischen Jahr zwischen dem 1.5.1977 und dem 31.3.1978 im Klinikum der Universität Tübingen, schloß ich das Medizinstudium mit dem dritten Teil der ärztlichen Prüfung am 27.4.1978 ab.

Zur Ausbildung zum Arzt für Allgemeinmedizin bin ich seit dem 1.7.1978 im Kreiskrankenhaus Freudenstadt tätig.